



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

“Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los  
residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

**I.AI. MARIA LUISA CABRERA SOTO**

DIRECTORES:

**DRA. BLANCA ESTELA BARRAGÁN HUERTA**  
**M. en C. MARIA TERESA CRUZ Y VICTORIA**

*México, D.F. Noviembre 2011*





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 14 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La E. N. C. B. para examinar la tesis titulada:  
**Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato.**

Cabrera Soto María Luisa  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)  
Con registro: 

B	0	9	1	0	6	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:  
Maestría en Ciencias en Alimentos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**  
Directores de tesis

\_\_\_\_\_  
Dra. Blanca Estela Barragán Huerta

\_\_\_\_\_  
M. en C. María Teresa Cruz y Victoria

\_\_\_\_\_  
Dra. Irasema Anaya Sosa

\_\_\_\_\_  
M en C Yoja Teresa Gallardo Navarro

\_\_\_\_\_  
Dr. José Luis Muñoz Sánchez

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. del Socorro López Cortez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Jesús Piñón López



**S. E. P.**  
Escuela Nacional de  
Ciencias Biológicas  
Sección de Estudios  
de Posgrado  
e Investigación



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F., el día 21 del mes de noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Maria Luisa Cabrera Soto alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos con número de registro B091065, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barragán Huerta y M. en C. Maria Teresa Cruz y Victoria ceden los derechos del trabajo intitulado **Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [bbarraga59@yahoo.com](mailto:bbarraga59@yahoo.com), si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

\_\_\_\_\_  
Maria Luisa Cabrera Soto  
Nombre y firma alumno (a)

Vo. Bo  
Directores de Tesis:

\_\_\_\_\_  
Dra. Blanca Estela Barragán Huerta

\_\_\_\_\_  
M en C. Maria Teresa Cruz y Victoria

El proyecto de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Residuos Peligrosos** perteneciente al Departamento de Ingeniería en Sistemas Ambientales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Durante el desarrollo de la tesis, se tuvo el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de becario 232490. También se contó con el apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores, dependiente de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, a través del proyecto SIP: 20110775.

# AGRADECIMIENTOS

Durante estos dos años de estudio en la maestría, son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me prestaron de forma incondicional y desinteresada.

A la Dra. Blanca E. Barragán Huerta y la M. en C. María Teresa Cruz y Victoria, por haber provisto todo lo necesario para la realización de este trabajo, por las observaciones acertadas para la mejora de este proyecto y por darme la oportunidad de mejorar en el ámbito profesional.

A las Dras. María del Socorro López Cortez e Irasema Anaya Sosa, a la M. en C. Yoja Teresa Gallardo Navarro y al Dr. José Luis Muñoz Sánchez, por el tiempo que dedicaron a la revisión del trabajo final y por las observaciones realizadas al mismo, con el afán de mejorarlo.

Al Dr. Manuel Soriano, del Instituto de Química de la UNAM, a quien agradezco profundamente su apoyo entusiasta y desinteresado, facilitándome material, equipo y un espacio de trabajo en su laboratorio. ¡Muchas gracias!

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente a la Dra. María Teresa Colinas León y al Quím. Cecilio Bautista Bañuelos, del Departamento de Fitotecnia, por apoyarme incondicionalmente con el uso de la liofilizadora de su laboratorio. ¡Gracias por la disposición que mostraron en todo momento!

A la M. en C. Laura Isabel Almazán Rodríguez, quien a pesar de no haber formado parte de la Comisión Revisora, realizó intervenciones y sugerencias valiosas para la mejora de este trabajo. Gracias por su amistad, amabilidad y disposición.

A la empresa tequilera Sauza, del estado de Jalisco, así como a la M. en C. Leticia Quintero Quiroz, por su apoyo en la donación de las hojas de *Agave tequilana* Weber.

A todos mis profesores, por sus sabios consejos, su tolerancia, su amistad y por compartir sus conocimientos conmigo.

A todos mis compañeros, porque al pasar los años, siempre tendré presente todo aquello que viví con ustedes. Gracias por haber fomentado en mí, el deseo de superación en la vida, especialmente a Flor, Laurita, Jenny y Normita, quienes más que amigas y compañeras de laboratorio, fueron mis maestras. Gracias por compartir su experiencia y conocimientos conmigo y apoyarme en la realización de este proyecto.

# DEDICATORIAS

## *A Dios:*

*Por concederme la vida para llegar hasta este momento y lograr otra meta más en mi carrera. Gracias por regalarme una familia maravillosa y por darme sabiduría, paciencia y fuerza necesarias para no decaer en el camino.*

## *A mis amados padres:*

*Con todo mi amor y admiración, porque este logro no hubiera sido posible sin su apoyo, desvelos y sacrificios. Gracias por creer en mí a pesar de los momentos difíciles. Los quiero con todo mi corazón y los llevo conmigo en todo momento.*

## *A mis hermanas:*

*Porque este logro es también de ustedes, por estar conmigo y apoyarme siempre; las quiero mucho y espero no decepcionarlas.*

## *A Evandro:*

*Por su amor, comprensión, paciencia y constante estímulo. Gracias por compartir a mi lado esta meta profesional y por ser un apoyo incondicional en mi vida.*

## *A mis amigos:*

*Jenny, Flor, Nomy, Ramón, Elí, Carol, Diana Humano, Lala, Jonh Wall-E, Normita, Andy, Sandy ESIQIE, Laurita e Isa, por sus consejos, regaños, palabras de aliento y por hacer más ameno cada momento de mi estancia en la maestría. Gracias por recordarme que la amistad es uno de los grandes tesoros que tiene el ser humano. Siempre los llevaré en mi corazón y este trabajo también es de ustedes.*

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE ECUACIONES	iv
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Lignina	2
2.2 Hongos degradadores de la lignina	5
2.2.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
2.3 Enzimas que intervienen en la degradación de la lignina	10
2.3.1 Lignino peroxidasa (LiP)	11
2.3.2 Manganese peroxidasa (MnP)	11
2.3.3 Lacasas (Lac)	11
2.3.3.1 Factores que influyen en la producción de lacasa	15
2.3.3.2 Inducción de lacasas	15
2.3.3.3 Aplicaciones de las lacasas	17
2.3.3.3.1 Industria del papel	17
2.3.3.3.2 Industria textil	18
2.3.3.3.3 Nanobiotecnología	19
2.3.3.3.4 Biorremediación	19
2.3.3.3.5 Cosméticos	20
2.3.3.3.6 Alimentos	21
2.4 Purificación de las enzimas	22
2.4.1 Precipitación con sulfato de amonio	23
2.4.2 Cromatografía de intercambio iónico	24
2.4.3 Cromatografía por filtración en gel	26
2.4.4 Métodos electroforéticos	27
2.5 Caracterización de las enzimas	28
2.5.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática	29
2.5.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	29
2.5.3 Constantes cinéticas enzimáticas	30
2.5.3.1 Teoría de la velocidad de reacción absoluta	35
2.6 <i>Agave tequilana</i> Weber	37
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. General	41
4.2. Particulares	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1 Cepas fúngicas	42
5.1.1 Reactivación de cepas fúngicas	42
5.2 Preparación del inóculo fúngico	44
5.3 Acondicionamiento de las pencas de <i>Agave tequilana</i> Weber	44
5.4 Selección de la cepa productora de lacasas	45

5.5 Actividad lacasa	46
5.6 Determinación de proteína	47
5.7 Producción de lacasas por el hongo seleccionado	48
5.7.1 Cinética de producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida	48
5.7.2 Cinética de producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación en estado sólido	49
5.7.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida	50
5.7.4 Efecto de la composición del medio sobre la producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida	51
5.7.5 Escalamiento a nivel matraz	53
5.7.6 Escalamiento en biorreactor	53
5.8 Purificación parcial de la lacasa	54
5.8.1 Precipitación con sulfato de amonio	54
5.8.2 Cromatografía de exclusión molecular	56
5.9 Caracterización de la lacasa	57
5.9.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	57
5.9.2 Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción	59
5.9.3 Efecto de la concentración de ABTS sobre la actividad lacasa	60
5.9.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	60
5.9.5 Termoestabilidad de la lacasa	61
5.9.6 Efecto del pH sobre la actividad lacasa	61
5.9.7 Análisis estadístico	61
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
6.1 Selección de la cepa productora de lacasas	62
6.2 Cinética de producción de lacasas por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida	62
6.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida	68
6.4 Efecto de la composición del medio sobre la producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida	73
6.5 Cinética de producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación en estado sólido	79
6.6 Producción de lacasas	84
6.6.1 Producción a nivel de matraz	84
6.6.2 Producción a nivel bioreactor	85
6.7 Purificación parcial de la lacasa	87
6.7.1 Precipitación con sulfato de amonio	87
6.7.2 Cromatografía de filtración en gel	87
6.8 Caracterización de la lacasa parcialmente purificada	90
6.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	90
6.8.2 Efecto de la concentración de enzima parcialmente purificada, sobre la velocidad de reacción	95
6.8.3 Efecto de la concentración de ABTS sobre la actividad lacasa	96
6.8.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	105

6.8.5 Estabilidad a la temperatura	113
6.8.6 Efecto del pH sobre la actividad lacasa	115
7. CONCLUSIONES	119
8. BIBLIOGRAFÍA	120
ANEXOS	133

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación taxonómica del hongo <i>P. ostreatus</i>	8
Cuadro 2.	Bacterias, insectos y hongos que presentan actividad lacasa	12
Cuadro 3.	Clasificación botánica del <i>Agave tequilana</i> Weber	38
Cuadro 4.	Diseño experimental para la determinación del efecto de la composición del medio, sobre la producción de lacasas por <i>P. ostreatus</i> , utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato	52
Cuadro 5.	Cantidades necesarias para la preparación del gel concentrador de poliacrilamida al 5 %	58
Cuadro 6.	Cantidades necesarias para la preparación del gel de separación de poliacrilamida al 10 %	58
Cuadro 7.	Volúmenes de reactivo para la cinética de concentración de enzima, sobre la velocidad de reacción	60
Cuadro 8.	Actividad enzimática y contenido de proteína extracelular de <i>P. ostreatus</i> a diferentes ciclos de producción en un biorreactor de lecho fluidizado en fermentación sumergida utilizando penca de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato	86
Cuadro 9.	Purificación parcial de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> utilizando penca de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato	89
Cuadro 10.	Variables para determinar el peso molecular de las proteínas que aparecieron en el gel de electroforesis	91
Cuadro 11.	Valores de $K_M$ y $V_{max}$ obtenidos con diversos métodos gráficos	102
Cuadro 12.	Propiedades cinéticas de otras isoformas de lacasas fúngicas	103
Cuadro 13.	Variables para el cálculo de la energía de activación ( $E_a$ )	106
Cuadro 14.	Variables para el cálculo de la energía de desnaturalización ( $E_d$ )	108
Cuadro 15.	Parámetros termodinámicos de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras moleculares de la lignina, hemicelulosa y celulosa, en la pared celular secundaria de plantas herbáceas	4
Figura 2.	Fotografías del cuerpo fructífero y crecimiento micelial, de <i>P. ostreatus</i>	9
Figura 3.	Curva de crecimiento micelial de <i>P. ostreatus</i>	10
Figura 4.	Estructura terciaria de la lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	13
Figura 5.	Principio de la cromatografía de intercambio iónico	25
Figura 6.	Esquema de la cromatografía de filtración en gel	26
Figura 7.	Diferencia entre la electroforesis nativa (NATIVA-PAGE) y electroforesis desnaturante (SDS-PAGE)	28
Figura 8.	Representación del modelo enzimático de llave-cerradura	31
Figura 9.	Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción	32
Figura 10.	Diagrama de energía libre para la reacción simple	33
Figura 11.	Representación del cambio en la energía libre de activación de una reacción, catalizada con y sin enzima	34
Figura 12.	Efecto de un catalizador sobre la energía de activación	35
Figura 13.	Cambio de la energía de la reacción durante la conversión de reactante A, a producto P, de acuerdo a la teoría de la velocidad de reacción absoluta.	36
Figura 14.	Fotografía del <i>Agave tequilana</i> Weber y anatomía de la planta	39
Figura 15.	Estrategia experimental desarrollada para la producción de lacasa de <i>P. ostreatus</i> , utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato.	43
Figura 16.	Fotografía de la fibra y penca de <i>Agave tequilana</i> Weber empacada en bolsas de polietileno.	45
Figura 17.	Curva tipo de proteína	48
Figura 18.	Producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida utilizando fibra y penca de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato.	49
Figura 19.	Producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación en estado sólido utilizando fibra y penca de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato.	50
Figura 20.	Producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida con diferentes concentraciones de fibra y penca de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato.	51
Figura 21.	Producción de lacasa de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sumergida en un biorreactor de lecho fluidizado utilizando penca de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato.	54
Figura 22.	Fotografía de la diálisis del extracto enzimático	55
Figura 23.	Liofilización del extracto dializado de lacasa	55
Figura 24.	Fotografía de la introducción de la muestra en la columna empacada con Sephadex G-75 y columna y colector utilizados para el fraccionamiento del extracto enzimático en base al tamaño molecular	57
Figura 25.	Fotografía del Filtro AMICON <sup>®</sup> , utilizado para concentrar la fracción enzimática de interés	57

Figura 26.	Cinética de producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	63
Figura 27.	Concentración de proteína extracelular de <i>P. ostreatus</i> , utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	66
Figura 28.	Actividad específica de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	67
Figura 29.	Cinética de producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> , con diferentes concentraciones de residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	69
Figura 30.	Concentración de proteína extracelular de <i>P. ostreatus</i> con diferentes concentraciones de residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	71
Figura 31.	Actividad específica de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> con diferentes concentraciones de residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	73
Figura 32.	Efecto de la composición del medio sobre la producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	75
Figura 33.	Efecto de la composición del medio sobre el contenido de proteína extracelular de <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	78
Figura 34.	Efecto de la composición del medio sobre la actividad específica de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sumergida	79
Figura 35.	Cinética de producción de lacasa por <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sólida	81
Figura 36.	Concentración de proteína extracelular de <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sólida	83
Figura 37.	Actividad específica de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> utilizando los residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato en fermentación sólida	84
Figura 38.	Producción de lacasa a nivel de matraz	85
Figura 39.	Perfil de elución y actividad lacasa en gel de Sephadex G-75	88
Figura 40.	NATIVA-PAGE de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> parcialmente purificada, producida con penca de <i>Agave tequilana</i> Weber como sustrato	90
Figura 41.	Curva tipo para determinar el peso molecular de las bandas proteicas de interés	92
Figura 42.	Perfil de intensidad de las proteínas presentes en el gel de electroforesis	93
Figura 43.	Relación de la velocidad de reacción con la concentración de lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	96
Figura 44.	Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción	97

	de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	
Figura 45.	Representación del diagrama de Lineweaver-Burk para los datos obtenidos de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	99
Figura 46.	Representación del diagrama de Eadie-Hofstee para los datos obtenidos de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	100
Figura 47.	Representación del diagrama de Augustinsson para los datos obtenidos de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	101
Figura 48.	Efecto de la temperatura sobre la actividad lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	106
Figura 49.	Gráfico de Arrhenius para la energía de activación de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada.	107
Figura 50.	Gráfico de Arrhenius para la energía de desnaturalización de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	109
Figura 51.	Estabilidad a la temperatura de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada.	114
Figura 52.	Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada	116
Figura 53.	Determinación del pK 1 y pK 2 de la lacasa producida por <i>P. ostreatus</i> , parcialmente purificada, de acuerdo al método de Dixon-Webb.	117

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	Velocidad de reacción	36
Ecuación 2	Velocidad de reacción para el estado de transición	36
Ecuación 3	Velocidad de reacción en base a la teoría de velocidad de reacción absoluta	37
Ecuación 4	Energía libre estándar para el estado de transición	37
Ecuación 5	Energía de activación	37
Ecuación 6	Entropía estándar para el estado de transición	37
Ecuación 7	Actividad lacasa	46
Ecuación 8	Movilidad relativa de las proteínas en gel de electroforesis	59
Ecuación 9	Recíprocos de la ecuación de Michaelis-Menten	98
Ecuación 10	Ecuación de Lineweaver-Burk	98
Ecuación 11	Número de recambio ( $k_{cat}$ )	102

## LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

Abreviatura	Significado
$A_{280}$	Absorbencia a 280 nm
ABTS	Ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico)
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
[E]	Concentración de enzima
$E_a$	Energía de activación
$E_d$	Energía de desnaturalización
[E] <sub>t</sub>	Concentración total de la enzima (Forma libre y combinada)
E.C.	Número de la Comisión de Enzimas
ED	Extracto dializado
[ES]	Concentración del complejo enzima-sustrato
Fd	Factor de dilución
FES	Fermentación en estado sólido
FESUM	Fermentación sumergida
F-SG-SH	Fibra-Sin glucosa-Sin Hongo
g	Gramos
<i>g</i>	Gravedades
h	Horas
<i>h</i>	Constante de Planck
H-F-AE	Hongo-Fibra-Agua estéril como medio
H-F-G	Hongo-Fibra-Glucosa
H-F-SG	Hongo-Fibra-Sin glucosa
H-G-SA	Hongo-Glucosa-Sin agave
HL	Hongos ligninolíticos
HM-G-SA	Hongo muerto-Glucosa-Sin agave
H-P-AE	Hongo-Penca-Agua estéril como medio
HPB	Hongos de la podredumbre blanca
H-P-G	Hongo-Penca-Glucosa
H-P-SG	Hongo-Penca-Sin glucosa
H-SG-SA	Hongo-Sin glucosa-Sin agave
If	Fuerza iónica final
li	Fuerza iónica inicial
J	Joules
K	Temperatura en Kelvin
$k_B$	Constante de Boltzmann
$k_{cat}$	Número de recambio
Kcal	Kilocalorías
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramos
kGy	Kilo Gray
$K_M$	Constante de Michaelis
L	Litros

Lac	Lacasa
Lac <sub>ag</sub>	Lacasa de agave
Lip	Lignino Peroxidasa
MAC	Metabolismo ácido crasuláceo
min	Minutos
mm	Milímetros
mL	Mililitros
mM	miliMolar
μM	microMolar
MME	Medio mineral estéril
MnP	Manganeso Peroxidasa
N	Normalidad
nm	Nanómetros
NATIVA-PAGE	Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida
p/v	Relación peso/volumen
pH	Potencial hidrógeno
pK	Constante de disociación
P-SG-SH	Penca-Sin glucosa-Sin hongo
R	Constante de los gases ideales
Rf	Movilidad relativa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
[S]	Concentración de sustrato
[S <sub>0</sub> ]	Concentración inicial de sustrato
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
T	Temperatura en Kelvin
U	Unidades lacasa
V <sub>0</sub>	Velocidad inicial
V <sub>max</sub>	Velocidad Máxima
ΔG <sup>#</sup>	Energía libre estándar
ΔG <sub>d</sub> <sup>#</sup>	Energía libre estándar de desnaturalización
ΔG <sub>a</sub> <sup>#</sup>	Energía libre estándar de activación
ΔH <sup>#</sup>	Entalpía estándar
ΔH <sub>d</sub> <sup>#</sup>	Entalpía estándar de desnaturalización
ΔH <sub>a</sub> <sup>#</sup>	Entalpía estándar de activación
ΔS <sup>#</sup>	Entropía estándar
ΔS <sub>d</sub> <sup>#</sup>	Entropía estándar de desnaturalización
ΔS <sub>a</sub> <sup>#</sup>	Entropía estándar de activación
#	Estado de transición de una reacción química

## RESUMEN

La penca y fibra de *Agave tequilana* Weber, fueron estudiadas como sustrato para la producción de lacasa por *Pleurotus ostreatus* en fermentaciones sumergida y sólida, considerando que esta enzima tiene aplicaciones potenciales en la industria textil y papelera, principalmente, además de la industria alimentaria, farmacéutica, nanotecnología, biorremediación de suelos, destoxificación de aguas residuales, manufactura de detergentes, y transformación de antibióticos y esteroides. Sin embargo, el uso de los residuos de agave generados durante su cosecha para la producción del tequila, no se ha investigado. Los resultados, mostraron que las condiciones para la máxima producción de lacasa con penca y fibra en fermentación sumergida, son 120 h, con una concentración de sustrato de 1 % (p/v), produciendo 276.36 y 169.25 U L<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras que en fermentación sólida, únicamente se obtuvieron 6.96 U L<sup>-1</sup> a las 480 h con penca y 45.43 U L<sup>-1</sup>, a las 120 h con fibra. La adición de glucosa no causó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), sobre la producción de la enzima. Sin embargo, la limitación de nutrientes en el proceso de fermentación sumergida, utilizando un medio de cultivo compuesto de agua-penca-hongo, favoreció la producción de enzimas más activas, por lo que este medio se seleccionó para el escalamiento en matraz y biorreactor. Aunque las condiciones de trabajo se escalaron proporcionalmente, la producción de lacasa en matraces con un volumen de trabajo de 200 mL, no generó resultados satisfactorios, en tanto que en el escalamiento en biorreactores, solamente en el primer ciclo de producción, la actividad específica fue similar (10.69 U mg<sup>-1</sup>) a la encontrada a pequeña escala (14.68 U mg<sup>-1</sup>). A partir del segundo ciclo de fermentación, la actividad específica disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ). El extracto enzimático obtenido por precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> del medio de fermentación, se purificó parcialmente, obteniéndose dos fracciones por cromatografía de filtración en gel sobre Sephadex G-75, con la mayor actividad lacasa (fracción 33 y fracción 35). En ambas fracciones, se encontró la presencia de dos isoformas de lacasa, denominadas Lac<sub>ag</sub>1 y Lac<sub>ag</sub>2, con pesos moleculares de 67.7 y 60.4 kDa, respectivamente. Ambas fracciones se reunieron y se llevó a cabo la caracterización de la enzima, la cual tuvo una K<sub>M</sub> de 5.54 mM y una V<sub>max</sub> de 357.14 U min<sup>-1</sup>, mientras que la temperatura óptima fue a

40°C, con una velocidad de reacción máxima de 330.16 U min<sup>-1</sup>. La lacasa secretada por el hongo, no fue estable a la temperatura, pues únicamente entre 20 y 35 °C, la lacasa conservó más del 80 % de su actividad, después de 15 min de incubación, hecho que limita la aplicación de esta enzima en procesos de la industria papelera y textil, donde las temperaturas de proceso son superiores a 60 °C. Sin embargo, es posible de utilizarse en el área de alimentos, en la estabilidad de algunas bebidas como el vino. Así mismo, el pH óptimo para la máxima velocidad de reacción de la lacasa, fue de 4.0, valor que se encuentra dentro del intervalo reportado para estas enzimas. Además, se encontró que el pKa del grupo prototrópico involucrado en la acción de la enzima fue de 3.5 a 4.5, que corresponde al grupo β-carboxilo del ácido aspártico. Las energías de activación y desnaturalización fueron de 2.71 y 43.30 Kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

## ABSTRACT

The *Agave tequilana* Weber leaves and fiber were studied as substrate for laccase production by *Pleurotus ostreatus*, in submerged and solid-state fermentation, considering that this enzyme has potential applications in the textile and paper industry, mainly, besides the food industry, pharmaceutical, nanotechnology, bioremediation of soils, detoxification of waste water, detergent manufacturing and transformation of antibiotic and steroids. However, the use of waste generated during agave harvest for tequila production has not been investigated. The results show that the conditions for maximum laccase production with both leaves and fiber in submerged fermentation, were 120 h, with a substrate concentration of 1% (w/v), producing 276.36 and 169.25 U L<sup>-1</sup>, respectively, while in the solid state fermentation, only allowed 6.96 U L<sup>-1</sup> at 480 h with leaves, and 45.43 U L<sup>-1</sup> at 120 h with fiber. The addition of glucose showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) on enzyme production. However, the nutrient limitation in the submerged fermentation process using a medium composed of water-leaves-fungus, favored the production of more active enzymes, so that this medium was chosen for the flask and bioreactor scale. Although working conditions were scaled proportionally, laccase production in flasks with a working volume of 200 mL, did not produce satisfactory results, while in the scaling in bioreactors, only in the first production cycle, the specific activity was similar (10.69 U mg<sup>-1</sup>) to that found in a small scale (14.68 U mg<sup>-1</sup>). From the second fermentation cycle, the specific activity decreased significantly ( $p \leq 0.05$ ). The enzyme extract obtained by precipitation of the fermentation medium with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, was partially purified, yielding two fractions by gel filtration chromatography on Sephadex G-75, with the highest laccase activity (fraction 33 and fraction 35). In both fractions, we found the presence of two isoforms of laccase called Lac<sub>ag</sub>1 and Lac<sub>ag</sub>2, with a molecular weight of 67.7 and 60.4 kDa, respectively. Both fractions were combined and carried out the characterization of the enzyme, which had a K<sub>M</sub> of 5.54 mM and a V<sub>max</sub> of 357.14 U min<sup>-1</sup>, while the optimum temperature was 40 ° C with a maximum reaction rate of 330.16 U min<sup>-1</sup>. The laccase secreted by the fungus, was unstable to the temperature, since only at 20 and 35 °C, the laccase retained more than 80% of its activity at these temperatures, after 15 min of incubation, which limits the

application of this enzyme in the process of paper and textile industry, where process temperatures are above 60 °C, but can be used in the food area in the stability of some beverages such as wine. Likewise, the optimum pH for maximum rate of reaction of laccase was 4.0, a value that is within the range reported for these enzymes. Moreover, the pKa of the prototropic group involved in the enzyme action was from 3.5 to 4.5, corresponding to the  $\beta$ -carboxyl group of aspartic acid. The energy of activation and inactivation was 2.71 and 43.30 Kcal mol<sup>-1</sup>, respectively.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas (E. C. 1.10.3.2) son enzimas oxidasas extracelulares distribuidas en plantas, bacterias, algunos insectos y principalmente en hongos superiores, pero la fuente más importante de este tipo de hongos son los de la podredumbre blanca, en los que se incluye a *Pleurotus ostreatus* (Chawachart *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2003), para llevar a cabo la degradación de la lignina y la oxidación de compuestos aromáticos.

Aunque varios hongos son productores de lacasas, sus niveles de expresión son muy bajos, por lo que las condiciones de producción enzimática constituyen un factor determinante. Así, para mejorar dichas condiciones, es conveniente estudiar algunas aplicaciones y técnicas biotecnológicas, tales como el crecimiento en diversos medios de cultivo, con la variación de las fuentes de carbono y nitrógeno (Kirk y Fenn, 1982).

Las principales aplicaciones biotecnológicas de las lacasas son en la industria textil (en la decoloración de tintes) y en la industria del papel (en el proceso de blanqueado). Sin embargo, su uso también se ha extendido a la industria alimentaria (para la estabilidad de jugos y vinos), farmacéutica, nanotecnología, biorremediación de suelos (para degradar plásticos que contaminan al tener unidades de olefina y para la oxidación de contaminantes orgánicos y tóxicos), destoxificación de aguas residuales (en la remoción natural de xenobióticos aromáticos), manufactura de detergentes, y transformación de antibióticos y esteroides, por lo que el mercado industrial de la lacasa está valuado en 2 billones de dólares por año, con una tasa de crecimiento anual potencial del 3 a 5 % (Kunamneni *et al.*, 2006; Rodríguez y Toca, 2007; Desai y Nityanand, 2011).

Para la producción económica de lacasas fúngicas, se han utilizado diversos desechos agroindustriales, sin embargo, el uso de hojas o “pencas” de *Agave tequilana* Weber no se ha investigado.

En México, aproximadamente un millón de toneladas de agave tequilero son producidas y procesadas anualmente para la producción de tequila, proceso en el cual las pencas son removidas para la obtención del tallo y son abandonadas sobre los campos, considerándoseles como desechos (Huitrón *et al.*, 2008).

Por tal motivo y dada la constitución lignocelulósica de las hojas del *A. tequilana* (64.8% celulosa, 5.1 % hemicelulosa, 15.9 % lignina y 14.0 % extraíbles) (Balam *et al.*, 2005), los objetivos del presente trabajo fue: inducir y determinar la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*, empleando hoja (penca) y fibra de agave como sustrato; purificar parcialmente la lacasa fúngica producida y caracterizar dicha enzima, a fin de proponer una alternativa económica y ecológica para el aprovechamiento de estos residuos agroindustriales.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Lignina**

El término lignina deriva del latín “*lignum*” que significa madera, y después de la celulosa, es la sustancia biológica más importante, tanto en términos de su cantidad total en la tierra, como de su importancia estructural para el tejido leñoso o maderable (Bidwell, 1979).

La lignina es un biopolímero aromático heterogéneo y complejo, que se degrada por oxidación (Bourbonnais *et al.*, 1995; Pointing, 2001; Quintero *et al.*, 2006). Forma parte de las paredes secundarias de todas las plantas superiores, las cuales se componen de 41 a 45 % de celulosa, 30 % de hemicelulosa y 21 a 28 % de lignina (Figura 1), la cual no se comprime con facilidad y resiste los cambios en su forma; es decir, la lignina es más rígida que la celulosa y se encuentra en mayor cantidad en la madera (Salisbury y Ross, 1994; Cañas, 2009).

La lignina es insoluble en la mayoría de los disolventes y, esta insolubilidad, se debe en gran parte a su elevado peso molecular. Además, en estado natural se encuentra unida químicamente a la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular, mediante

enlaces éter y quizá de otros tipos, a los grupos hidroxilo de los polisacáridos (Salisbury y Ross, 1994). Por ello, es muy difícil de estudiar como compuesto químico, ya que no puede extraerse fácilmente sin que sufra una fuerte degradación. Sin embargo, los monómeros de la lignina pueden ser aislados y se ha encontrado que son principalmente alcoholes derivados de sustancias fenólicas simples, como alcoholes *coniferilo*, *sinapilo* y *p-cumarilo*. Los monómeros de la lignina se arreglan al azar, aparentemente, por medio de un complejo sistema de enlaces mutuos. La naturaleza de algunos de ellos es conocida, pero no lo es el arreglo integral de la lignina natural característica. El hecho importante es que, una cantidad grande de carbono metabolizado, es convertida en lignina por la vía del ácido shikímico. Esta vía tiene una importancia básica en la síntesis de muchos metabolitos importantes, que incluyen compuestos tan diversos como los aminoácidos de las proteínas, hormonas y materiales estructurales de las plantas (Bidwell, 1979).

La síntesis de este biopolímero se produce por la unión de radicales fenoxilo que se originan en la oxidación enzimática de alcoholes precursores. Se han implicado numerosas enzimas oxidativas en la síntesis de la lignina, fundamentalmente peroxidasas y fenol oxidasas y es de suponer que las ligninas siempre tienen estructuras variables (Salisbury y Ross, 1994).

La presencia de la lignina es un inconveniente para la utilización de celulosa y hemicelulosa en los procesos industriales y biotecnológicos, por lo que el estudio de su biodegradación tiene gran importancia. Existen una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) con las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la celulosa y la hemicelulosa, pero en lo referente a la degradación y mineralización de la lignina, el número de organismos es limitado. Los organismos descritos con la capacidad de degradar y mineralizar a la lignina, son un grupo de hongos denominados de pudrición blanca (Dedeyan *et al.*, 2000).

La lignina es una sustancia presente en la mayoría de los desperdicios agrícolas y la degradación de este polímero es producida por las enzimas ligninolíticas lignino

peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) (Jiménez *et al.*, 1999; Monroy y Viniestra, 1981).

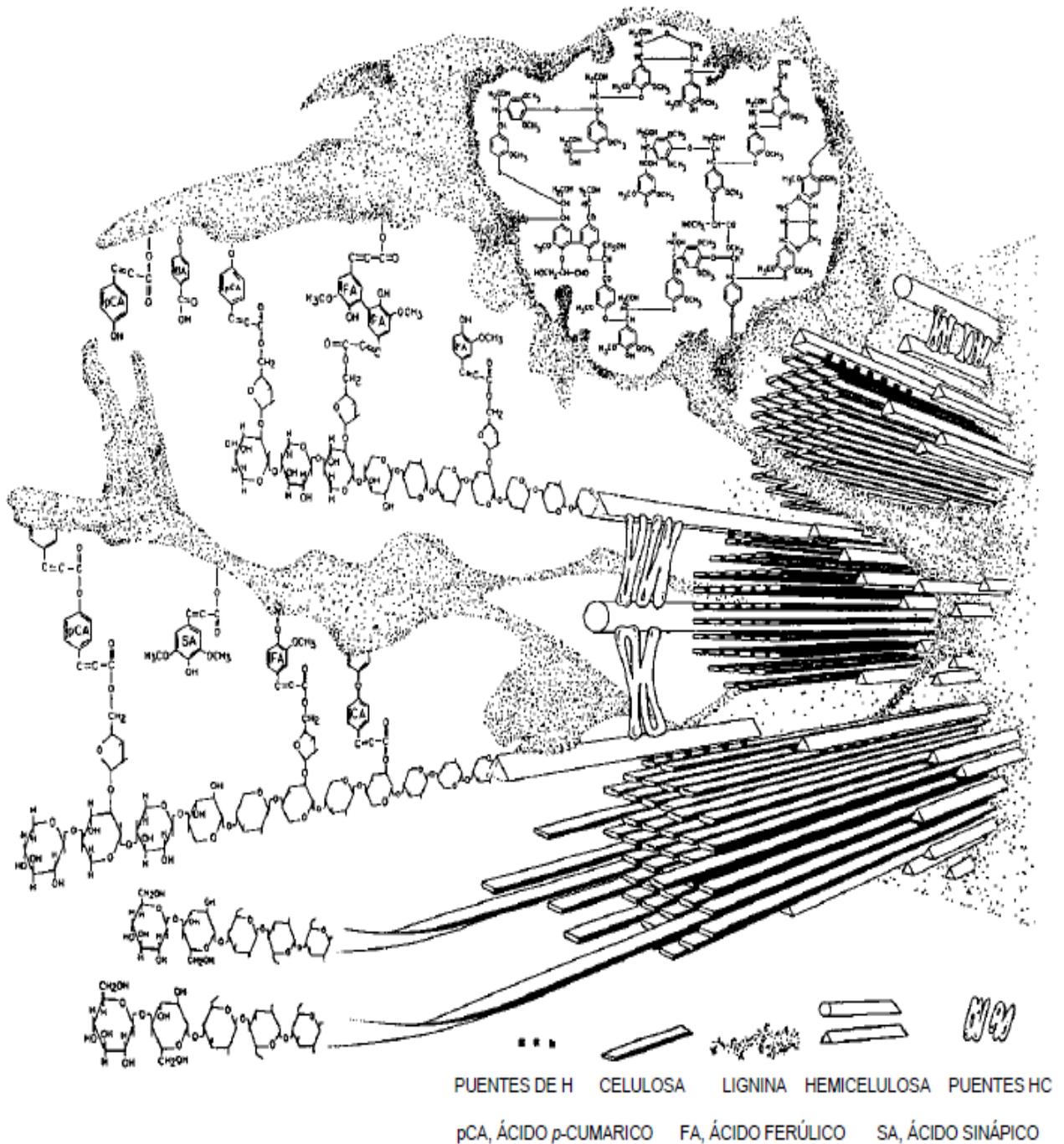


Figura 1. Estructuras moleculares de la lignina, hemicelulosa y celulosa, en la pared celular secundaria de plantas herbáceas (Cañas, 2009).

## 2.2 Hongos degradadores de lignina

En la naturaleza, existen diversos organismos que tienen la capacidad de degradar parcialmente la lignina. Sin embargo, los únicos organismos capaces de degradarla hasta su mineralización completa y producción de dióxido de carbono y agua, son los hongos basidiomicetos (Pointing, 2001), los cuales comprenden los grupos ecológicos de hongos de la podredumbre blanca, podredumbre café y podredumbre blanda (Songulashvili *et al.*, 2007). Esta habilidad de degradar completamente todos los compuestos lignocelulósicos, hacen de los hongos basidiomicetos, los organismos más prometedores para detoxificar efluentes industriales, por degradación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y se ha comprobado que son eficientes en el blanqueado de la pulpa y en las aguas de desecho de la fabricación del papel (Bourbonnais *et al.*, 1995; D'Souza *et al.*, 1996; Guillén *et al.*, 2000).

Varias especies de hongos basidiomicetos han sido estudiadas en los últimos años, particularmente los hongos de la podredumbre blanca (HPB), también llamados hongos ligninolíticos (HL) (Martínez *et al.*, 2005), que generan en la madera un aspecto blanquecino al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa y producen mayor cantidad de enzimas ligninolíticas extracelulares que tienen una potente capacidad oxidante de la molécula de lignina (Mouso *et al.*, 2003; Quintero *et al.*, 2006).

Las hifas de los HPB, invaden rápidamente las células de la madera y permanecen en la pared del lumen, secretan enzimas y metabolitos que provocan la depolimerización de la hemicelulosa, celulosa y la fragmentación de la lignina. Presentan dos patrones de descomposición: la pudrición simultánea donde la celulosa, hemicelulosa y lignina son removidas simultáneamente y, la deslignificación, en la cual la lignina es removida antes que la hemicelulosa y celulosa. Los HPB rompen la lignina por un proceso oxidativo por medio de fenol oxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como la Lac, MnP y LiP (Schwarze *et al.*, 2000).

El reciclaje de la lignina por los HL, es un factor fundamental del ciclo de carbono en los bosques, una de las mayores reservas de carbono orgánico del suelo (Pointing, 2001).

En la degradación enzimática de la lignina, intervienen una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero y dan como resultado la desestabilización de los enlaces y, finalmente, la ruptura de la macromolécula (Quintero *et al.*, 2006).

La cantidad relativa de lignina y polisacáridos degradados y utilizados por los HL a través de sus enzimas, varía al igual que el orden de ataque de ellas. Normalmente los HL atacan simultáneamente celulosa y lignina, convirtiendo esta última hasta un 70% en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Manzano *et al.*, 2004). Tras la degradación de la lignina, se acumulan celulosa y hemicelulosa, que son las responsables del color blanquecino característico que aparece durante la degradación de la madera por estos hongos (Murrieta *et al.*, 2002).

En la mayoría de los hongos, se ha visto que la ligninólisis se produce durante el metabolismo secundario; es decir, durante la limitación de nutrientes, lo que permite que el hongo sólo sintetice y secrete agentes ligninolíticos que comiencen a fragmentar el polímero (Sathia *et al.*, 2006).

Glazer y Nikaido (1998), señalaron que la vía metabólica realizada por varios HL inicia por la mediación de la enzima LiP, la cual rompe enlaces C-C o enlaces éter (C-O-C) de las cadenas arilpropano, formando monolignoles como el ácido ferúlico, que luego de la acción de las enzimas LiP y MnP pasa a vainillina. Además de los monolignoles, pueden generarse dilignoles u oligolignoles sobre los que actúa de nuevo la enzima LiP rompiendo los enlaces éter, para dar origen a nuevos monolignoles como el alcohol coniferílico, que al oxidarse forma coniferil aldehído y guaicil glicerol, que al oxidarse forma 3-metoxi-4-hidroxifenil pirúvico. Cada una de estas dos moléculas, al sufrir una descarboxilación oxidativa, da origen a una molécula de vainillina, la cual

sufre una nueva descarboxilación oxidativa, convirtiéndose en ácido vainílico. Sobre esta molécula actúa la enzima lacasa realizando un proceso de desmetilación para dar origen al ácido protocatéuico, que al sufrir una oxidación mediada por la LiP y oxigenasas, se convierte a ácido  $\beta$ -carboxi-cis-mucónico; éste al oxidarse forma el ácido  $\beta$ -oxiadípico, que a su vez, sufre una hidrólisis que rompe los enlaces C-C para formar ácido acético que entra al ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs al convertirse en acetil-CoA, al igual que el ácido succínico, que entra directamente a dicho ciclo. El producto final de este ciclo es CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.

Los HL están adaptados a una amplia variedad de desechos agroindustriales, como la paja de cereales (trigo, cebada y arroz), bagazo de caña, aserrín, desechos de algodón, hojas de plátano, pulpa de café, entre otros, gracias a su composición lignocelulósica que induce la producción y secreción de enzimas que degradan la lignina (Chawachart *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; Pointing, 2001). Así, la utilización de sustratos lignocelulósicos insolubles por los HL depende de la producción y secreción de enzimas (Murrieta *et al.*, 2002).

De todos los hongos basidiomicetos, sólo un pequeño porcentaje ha sido estudiado para la producción de lacasas, y entre ellos se encuentran los siguientes géneros:

*Agaricus, Antrodiella, Armillaria, Aspergillus, Bjerkandera, Botrytis, Ceriporiopsis, Cerrena, Chaetomium, Coprinus, Cryphonectria, Cryptococcus, Curvularia, Cyathus, Geotrichum, Daedalea, Fomes, Fusarium, Halosarpheia, Lactarius, Lentinus, Monocillium, Myceliophthora, Neurospora, Penicillium, Phanerochaete, Phellinus, Phlebia, Pholiota, Pleurotus, Podospora, Pycnoporus, Pyricularia, Rhizoctonia, Rigidoporus, Schizophyllum, Sclerotium, Scytalidium, Sporotrichum, Stagonospora, Thermoascus, Trichoderma y Trametes* (Pinzón, 2004).

### **2.2.1 *Pleurotus ostreatus***

Se ha estimado la existencia de aproximadamente 250 000 especies diferentes de hongos en la naturaleza (Herrera y Ulloa, 1998). Gastón Guzmán y col. (1993), estimaron que la biodiversidad de los hongos en México, fue alrededor de 120 000

especies (micro y macroscópicas), de las cuales 10 000 producen cuerpos fructíferos macroscópicos, entre los que se encuentra al género *Pleurotus*. Dicho género pertenece a la clase basidiomicetos y comprende a los hongos superiores cuya principal característica es la presencia de basidios o protuberancias sobre las cuales se producen basidiosporas. En el Cuadro 1, se muestra la ubicación taxonómica del género *Pleurotus*.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del hongo *P. ostreatus*

Reino	Fungi
Phylum	Basidiomicete
Clase	Agaricomycete
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	spp

Fuente: Kirk *et al.*, 2001

El género *Pleurotus*, es un grupo cosmopolita de hongos con alto valor nutricional, que incluye especies de hongos comestibles y medicinales que pertenecen al grupo de hongos de podredumbre blanca (Stajic *et al.*, 2006; Locci *et al.*, 2008). Son hongos saprófitos cuya capacidad de penetración de sus hifas, les permite degradar incluso materias estructuralmente complejas, como la madera o cutículas de insectos. Estos hongos producen enzimas que intervienen en la degradación de celulosa y lignina, obteniendo así su fuente de carbono y los nutrientes minerales necesarios para su crecimiento (Cisterna, 2003).

En estudios realizados con macromicetos, se ha observado que los requerimientos de estos organismos pueden variar según los nutrientes presentes en el medio, por lo que la utilización de sustratos adecuados, es conveniente para el crecimiento óptimo de los hongos; si el medio de cultivo contiene todos los requerimientos nutritivos, en cantidad suficiente para que el organismo sintetice sus metabolitos y tome la energía que requiere, entonces el hongo crecerá adecuadamente (Sánchez y Royse, 2001).

El carbono es necesario para los hongos, dado que es la fuente directa de energía para su metabolismo. Así mismo, es necesario para la formación de las diferentes partes y estructuras celulares. Dada la importancia que tiene para la vida de las células, este elemento es el que se requiere en mayor cantidad (Cisterna, 2003). El carbono puede ser utilizado por el hongo a partir de diferentes fuentes como polímeros (celulosa y lignina), o carbohidratos. Éstos últimos se encuentran entre las fuentes de carbono preferidas por las especies de *Pleurotus*. Según Rypacek (1977), la glucosa, la manosa y la galactosa son buenos sustratos para este género fúngico.

Particularmente el nombre de *Pleurotus ostreatus* deriva de su forma “de ostra” y también es llamado “pleuroto en forma de concha”, “seta de chopo”, “seta de ostra”, “orellana” o “pleuroto ostreado” (Zanón *et al.*, 2005).

Macroscópicamente, *Pleurotus ostreatus* presenta crecimiento micelial blanco algodonoso, con abundante micelio aéreo y con formación de anillos desde el centro de la caja hacia su periferia, como se presenta en la Figura 2 (Cisterna, 2003; Fernández y Henao, 2007).

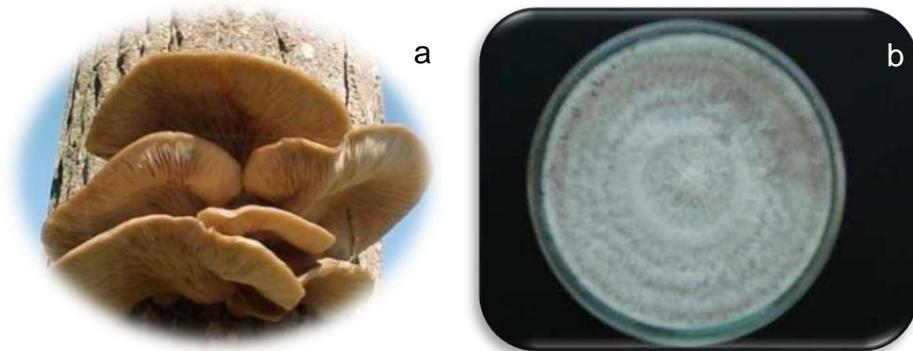


Figura 2. Fotografías del cuerpo fructífero (a) y crecimiento micelial (b) de *P. ostreatus* (Cisterna, 2003).

Dicho crecimiento micelial varía según si se realiza en un medio líquido o en un medio sólido. En el primer caso, sólo crece sobre la superficie cuando el líquido está en reposo, pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. Según las condiciones, el hongo puede o no formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets”. En medio líquido, los hongos suelen presentar un

desarrollo típico, similar al de otros organismos y que consta de las siguientes fases: de adaptación o fase lag; exponencial o fase log; estacionaria, declinación y muerte (Figura 3). Cuando el crecimiento de un hongo se da en un medio sólido, en lugar de fase exponencial se presenta una fase de crecimiento más o menos lineal (Sánchez y Royse, 2001).

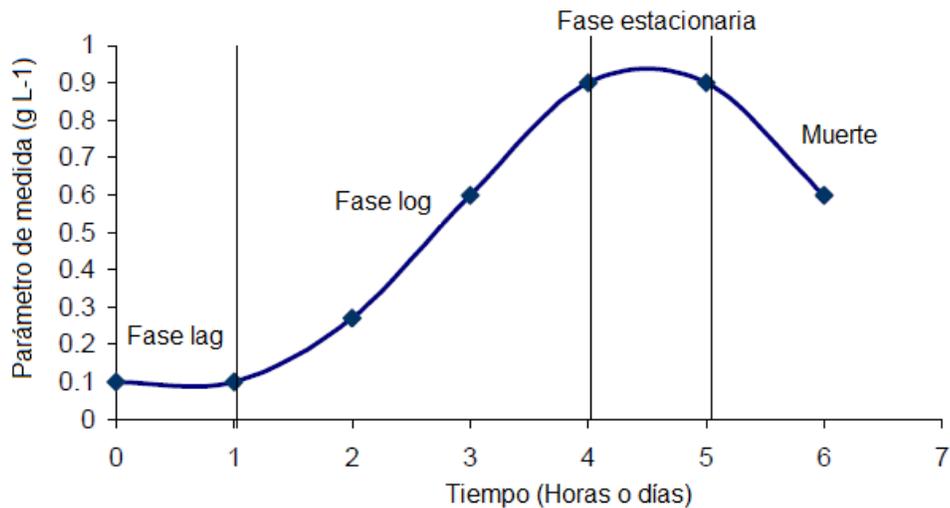


Figura 3. Curva de crecimiento micelial de *P. ostreatus* (Sánchez y Royse, 2001).

Respecto a la actividad lacasa de *P. ostreatus*, este HL ha mostrado una fuerte actividad entre los hongos comestibles y su cultivo es relativamente fácil. Sin embargo, la aplicación práctica a gran escala sobre el sistema enzimático aún no ha sido desarrollada comercialmente de manera eficiente, pues existen factores que influyen sobre la producción de las enzimas ligninolíticas (Krishna *et al.*, 2005).

### 2.3 Enzimas que intervienen en la degradación de la lignina

Las enzimas son catalizadores naturales; todas las funciones vitales de los seres vivos se realizan con un complejo sistema enzimático. Las enzimas tienen varias ventajas sobre los catalizadores químicos: son baratas, las enzimas y sus productos son biodegradables, operan a temperatura y presión moderadas y algunas enzimas son selectivas para un solo tipo de reacción. Sin embargo, algunos disolventes, cambios bruscos de pH y de temperatura, las pueden desnaturizar, perdiendo así su actividad (Solís-Oba *et al.*, 2007).

Las enzimas producidas por los hongos ligninolíticos involucradas en la degradación de la lignina son: lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) (Tlecuitl *et al.*, 2008).

### **2.3.1 Lignino peroxidasa (LiP)**

Esta enzima fue descrita por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium*; es una glicoproteína monomérica que contiene un grupo hemo (Glenn *et al.*, 1983). Se distingue de otras peroxidases por su alto potencial oxido-reducción, lo que le permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos y, por tanto, la mayor parte de las unidades de la lignina (Tien, 1987).

### **2.3.2 Manganeso peroxidasa (MnP)**

Fue la primera enzima aislada del medio extracelular de cultivos ligninolíticos del hongo *P. chrysosporium*, la cual es considerada la enzima clave en la ligninólisis de este hongo. La MnP requiere peróxido de hidrógeno como co-sustrato y cataliza la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ . Éste último actúa como agente primario en la ligninólisis con ácidos orgánicos, como ácido málico y oxálico. Esta enzima es estable a elevadas temperaturas y los niveles de peróxido de hidrógeno pueden ser incrementados (Sasaki *et al.*, 2001). La MnP no puede oxidar los sustratos de lignina no fenólicos como el alcohol veratrílico (Glazer y Nikaido, 1998).

### **2.3.3 Lacasas (Lac)**

Los HL secretan, cuando son cultivados en condiciones apropiadas, una oxidasa extracelular denominada lacasa (Rodríguez *et al.*, 2002), la cual es de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde finales del siglo XIX (Baldrian, 2006) y que más se ha estudiado su aplicación industrial (Solís-Oba *et al.*, 2007). Fue descrita por Yoshida en 1883 y caracterizada por Bertrand en 1985 como una oxidasa que contiene un metal. Esto facilitó la descripción de la lacasa como una de las enzimas más antiguas, la cual ha sido detectada en varias especies de plantas, como el árbol de la laca, mango, durazno, ciruela (Mayer y Staples, 2002), coles, nabos, papas, manzanas y otros vegetales (Shraddha *et al.*, 2011).

La lacasa (E.C.1.10.3.2, *p*-bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa) es una oxidoreductasa capaz de catalizar la oxidación de varios compuestos aromáticos (particularmente fenoles), diaminas y aminas aromáticas, por la transferencia de un electrón, usando el oxígeno molecular como el aceptor del electrón y la consecuente reducción del oxígeno a agua (Chawachart *et al.*, 2004; Guo-Qing *et al.*, 2009). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, insectos y bacterias, pero la fuente más importante de lacasas son los hongos superiores (Chawachart *et al.*, 2004; Shraddha *et al.*, 2011). En el Cuadro 2, se presentan algunos organismos con presencia de lacasa.

Cuadro 2. Bacterias, insectos y hongos que presentan actividad de lacasa

Presencia de lacasa en diversos organismos	Especies
Bacterias	<i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Marinomonas mediterránea</i> , <i>Streptocarpus cyaneus</i> y <i>Streptomyces lavendulae</i>
Insectos	<i>Bómbix</i> , <i>Calliphora</i> , <i>Diploptera</i> , <i>Drosophila</i> , <i>Lucilia</i> , <i>Manduca</i> , <i>Musca</i> , <i>Oryctes</i> , <i>Papilio</i> , <i>Phormia</i> , <i>Rhodnius</i> , <i>Sarcophaga</i> , <i>Schistocerca</i> y <i>Tenebrio</i>
Hongos	<i>Agaricus</i> , <i>Antrodiella</i> , <i>Armillaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Ceriporiopsis</i> , <i>Cerrena</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Coprinus</i> , <i>Cryphonectria</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Halosarpheia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Fomes</i> , <i>Daedalea</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Monocillium</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Myceliophthora</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phellinus</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Pholiota</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Podospora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Rigidoporus</i> , <i>Schizophyllum</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Sporotrichum</i> , <i>Stagonospora</i> , <i>Trametes</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Lentinus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Lactarius</i> y <i>Scytalidium</i>

Fuente: Castro, 2005; Shraddha *et al.*, 2011.

Se ha reportado que las lacasas contienen entre 15 y 30 % de carbohidratos, y que su masa molecular oscila entre 25 y 100 kDa (Galhaup *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2003; Shraddha *et al.*, 2011).

Así mismo, se sabe que estas enzimas contienen cuatro iones de cobre por molécula, que se clasifican en tres tipos: cobre tipo I ó T1 (donde tienen lugar la oxidación del sustrato reductor) y un “cluster” trinuclear formado por el cobre tipo II y los dos cobres tipo III, o bien T2/T3 (donde la reducción del oxígeno molecular tiene lugar por la aceptación de electrones del cobre tipo I) (Figura 4) (Cañas, 2009; Rodríguez y Toca, 2007; Shraddha *et al.*, 2011). Los tres tipos de cobre se pueden distinguir usando UV/Visible y resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés). El cobre tipo I es responsable del color azul de la proteína a una absorbencia de aproximadamente 610 nm y es detectable en la resonancia paramagnética electrónica; el cobre tipo II no confiere color, pero sí es detectable en la resonancia paramagnética electrónica, mientras que el cobre tipo III, constituido por un par de átomos de cobre en una conformación binuclear, tiene una débil absorbencia en la región del UV cercano, pero no es detectable por la señal de la resonancia paramagnética electrónica (Desai y Nityanand, 2011).

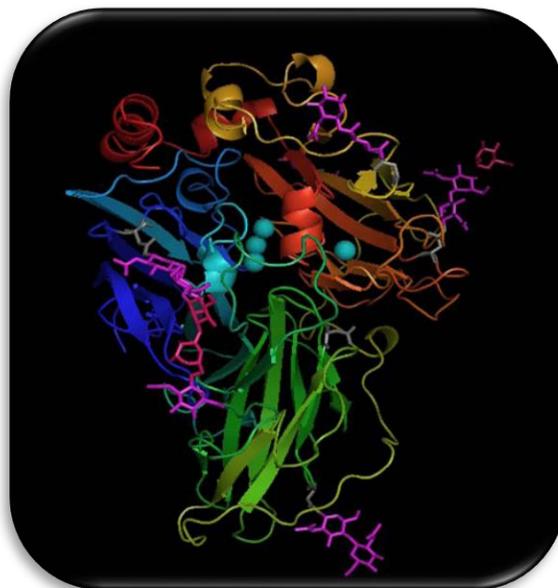


Figura 4. Estructura terciaria de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (Cañas, 2009).

Las lacasas están involucradas en diversas funciones fisiológicas en distintas especies. En plantas, desempeñan un papel importante en la biosíntesis de la lignina, mientras que las lacasas fúngicas desempeñan más funciones, incluyendo la esporulación, producción de pigmentos, formación de rizomorfas, fitopatogénesis, formación de cuerpos fructíferos, morfogénesis, defensa ante el estrés y degradación de la lignina (Galhaup *et al.*, 2002; Guo-Qing *et al.*, 2009; Minussi *et al.*, 2007).

Los HL son capaces de transformar y, algunas veces, mineralizar completamente varios contaminantes ambientales como anilinas y fenoles en presencia de oxígeno. Durante este proceso, los sustratos son oxidados por un electrón para generar los correspondientes radicales fenoxilo, los cuales se polimerizan para producir un polímero fenólico o bien, son oxidados por la lacasa para producir una quinona. Los electrones recibidos del sustrato son transferidos al oxígeno, el cual se reduce a agua (Tlecuítl *et al.*, 2008).

Todos los radicales que se obtienen de la oxidación con la lacasa, podrían actuar como mediadores. Un mediador de óxido reducción, es un compuesto orgánico de bajo peso molecular al cual la enzima le puede sustraer electrones, convirtiéndolo en un radical libre, el cual, a su vez, oxida a otros compuestos (sustratos), dependiendo de su potencial de oxidoreducción, sin la participación directa de la enzima en esta última reacción (Li *et al.*, 1999).

La elección del mediador juega un papel muy importante en la efectividad del sistema enzima-mediador. Se han descrito más de 100 mediadores; el ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico) (ABTS), es el mediador de la lacasa más estudiado debido a su alta estabilidad y a que su química redox es conocida. Potthast *et al.* (1995) explican que dichos compuestos mediadores, pueden incrementar significativamente la catálisis enzimática a través de la transferencia de electrones entre la lacasa y el sustrato, efecto que también modifica la capacidad de la enzima para oxidar indirectamente a los compuestos que normalmente no son sustratos de ésta.

### **2.3.3.1 Factores que influyen en la producción de lacasa**

Murrieta *et al.* (2002) enuncian que derivados de la lignina en el sustrato, influyen en la producción de enzimas como la lacasa. Así mismo, la habilidad de los hongos para producir esta enzima varía entre especies y aún entre cepas de la misma especie.

Dentro de los factores que inciden en la producción de lacasa, están la temperatura, el pH, la agitación, cantidad de inóculo, concentración de trazas minerales, composición del medio de cultivo, relación carbono/nitrógeno, tamaño de partícula y tipo de fermentación (Baldrian *et al.*, 2006; Chawachart *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 1999). También, el uso de diferentes compuestos aromáticos (ácido gálico, ferúlico, xilidina, guayacol, alcohol veratrílico) como inductores, han sido ampliamente usados para estimular la producción de lacasas (Rodríguez *et al.*, 2002).

Generalmente, las lacasas son más estables en pH alcalino que en pH ácido, lo cual se atribuye, probablemente, a la inhibición que el grupo hidróxido ejerce sobre el proceso de auto oxidación. Las lacasas conservan su actividad en un margen de pH de 3 a 10 y en un intervalo de temperatura de 5 a 55 °C. Se pueden inactivar por la pérdida de los átomos de cobre o por las condiciones de proteólisis o desnaturalización. Las lacasas termófila son más termoestables que las lacasas mesófilas (Ramírez *et al.*, 2003).

Bajas concentraciones de varias lacasas se producen en la madera y en cultivos de hongos sumergidos, mientras que altas concentraciones son inducidas por la adición de compuestos aromáticos como la xilidina y el ácido ferúlico (Ramírez *et al.*, 2003).

### **2.3.3.2 Inducción de lacasas**

Las lacasas fúngicas pueden ser constitutivas o inducibles y, también, intracelulares o extracelulares (Sariaslani, 1989). Estas enzimas han sido detectadas y purificadas de distintas especies de hongos, y se ha observado que se producen múltiples isoenzimas (Palmieri *et al.*, 2000). Varias lacasas encontradas son extracelulares y se asocian al crecimiento, por lo cual, se han controlado las condiciones de crecimiento

de las especies de hongos utilizados y después, se ha buscado promover la producción de las enzimas mediante la utilización de inductores. Éstos, son usualmente compuestos que tienen estructuras muy similares o análogas a los sustratos de la enzima y a los componentes de la lignina, y sirven como una señal a la célula para que produzcan alguna enzima específica (López, 2001).

Con el uso de inductores, una especie individual de hongo, puede expresar diferentes formas moleculares de lacasa con diversas condiciones para la detección de su actividad, como son pH óptimo, especificidad de sustrato, peso molecular, localización celular o condiciones de cultivo (Fernández-Larrea y Stahl, 1996). Por lo tanto, cada una de las lacasas tienen condiciones de expresión diversas y distintas propiedades moleculares, dependiendo de la especie fúngica y condiciones del medio ambiente (Desai y Nityanand, 2011; Giardina *et al.*, 2007).

En la actualidad, se han estudiado compuestos que tienen la capacidad de funcionar como inductores para la síntesis de lacasas en varias especies de hongos. Por ejemplo, el hongo *Coriolus hirsutus* ha sido inducido para la síntesis de lacasas extracelulares con un sustrato que es la siringaldazina, a una concentración de 0.11  $\mu\text{M}$ , teniendo un aumento cercano al 1000 %, obteniéndose así dos isoformas de la enzima, las cuales son I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> con pesos moleculares de 69 y 67 kDa y con un punto isoeléctrico de 3.5 y 4.2, respectivamente (Gorbatova *et al.*, 2000).

En 1980, Gigi y colaboradores, obtuvieron resultados de máxima producción de lacasas por el hongo *Botrytis cinérea* al adicionarle ácido gálico al medio de cultivo, ya que otros inductores reportados fueron inefectivos. Marbach y colaboradores (1983) encontraron que al adicionarle ácido cumárico al mismo hongo, se generó una acción de inducción a parte del ácido gálico y el jugo de uva, los cuales ya estaban reportados como inductores, por lo cual sugirió que el hongo se adaptó a diferentes medios secretando así distintas lacasas.

Hubert y Lerch (1987) indican que al adicionar un exceso de cobre al medio de cultivo, se provoca un efecto de inducción para la producción de lacasas. El cobre en el hongo comestible *P. ostreatus* promueve la expresión de las isoenzimas POXA1b, regulando así el nivel de la transcripción del gen (Palmieri *et al.*, 2000).

Sonden y Dobson (2001) utilizaron varios compuestos (ácido ferúlico, ácido verátrico, 2,5 xilidina e hidroxibenzotriazole) como inductores para el hongo *P. sajor-caju* y con la adición de cobre, para la expresión de la secuencia de los genes Psc lac 1, 2, 3 y 4. Los resultados fueron que, con el ácido ferúlico y 2,5 xilidina, se tuvo un nivel alto en la transcripción de los genes Psc lac 1, 2 y 4 y el Psc lac 3 fue expresado constitutivamente.

### **2.3.3.3 Aplicaciones de las lacasas**

Las aplicaciones prácticas de las lacasas, conducen a investigar nuevas fuentes de enzimas producidas por hongos así como el uso de mediadores que faciliten la acción de las enzimas (Mayer y Staples, 2002).

Las lacasas ofrecen diversas ventajas que son de gran interés para su aplicación biotecnológica (Baldrian, 2006), pues oxidan tanto compuestos tóxicos como no tóxicos, son específicas, ecológicamente sostenibles y principalmente, son catalizadores competentes (Shraddha *et al.*, 2011).

#### **2.3.3.3.1 Industria del papel**

La preparación industrial del papel requiere la separación y degradación de lignina en pulpa (Rodríguez y Toca, 2007). Convencionalmente, este proceso se realiza usando oxidantes químicos a base de contaminantes clorados y oxígeno (Kunamneni *et al.*, 2006). Los procesos de deslignificación con oxígeno se han introducido industrialmente en los últimos años para sustituir los métodos convencionales con cloro, pero pre-tratamientos de la pulpa con enzimas ligninolíticas, podrían proporcionar estrategias más limpias de deslignificación (Rodríguez y Toca, 2007).

Aunque se han realizado estudios extensos para el desarrollo de sistemas alternativos de bioblanqueo, pocos tratamientos enzimáticos muestran la capacidad de deslignificación que las tecnologías modernas de blanqueado químico tienen. Una razón importante para sustituir el blanqueo químico con cloro, por el bioblanqueo, es la eliminación de compuestos organoclorados del medio ambiente, dado que son altamente carcinogénicos (Rodríguez y Toca, 2007).

Las lacasas son utilizadas en la industria papelera para llevar a cabo el biopulpeo, que es un proceso fundamental para separar y eliminar la lignina de la celulosa (Deleé *et al.*, 1988).

#### **2.3.3.3.2 Industria textil**

Este tipo de industria ocupa las dos terceras partes del mercado total de colorantes, además de que consume grandes volúmenes de agua y sustancias químicas para el procesamiento húmedo de textiles (Desai y Nityanand, 2011; Rodríguez y Toca, 2007). Los reactivos químicos usados tienen diversa composición, que va de compuestos inorgánicos, a polímeros y productos orgánicos. Debido a su estructura química y origen sintético, los tintes son resistentes a la decoloración por exposición a la luz y al agua (Desai y Nityanand, 2011). Se ha estimado que en el mercado, existen más de 100 000 colorantes con una producción anual superior a  $7 \times 10^5$  t (Shraddha *et al.*, 2011).

La eliminación de colorantes de efluentes generados por la industria textil, es un problema de especial interés debido a que contienen colorantes tipo azo, que causan cáncer (Zheng *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 1999). Una alternativa para la remoción de estos colorantes, es el uso de reactores de flujo continuo con lacasas inmovilizadas.

La legislación gubernamental es cada vez más estricta, especialmente en los países más desarrollados, respecto a la remoción de colorantes de efluentes industriales. Así pues, el desarrollo de procesos basados en lacasas podría ser una solución atractiva, debido a su potencial en la degradación de colorantes de diversas estructuras

químicas, incluyendo aquéllos empleados actualmente en la industria (Rodríguez y Toca, 2007).

El uso de lacasas en la industria textil ha crecido rápidamente; se han usado para blanquear textiles y algunas veces para sintetizar colorantes (Desai y Nityanand, 2011). En cuanto al blanqueo de textiles, en 1996 Novozyme lanzó una nueva lacasa de aplicación industrial: DeniLite<sup>®</sup>, la primera lacasa industrial y la primera enzima blanqueadora que actúa con la ayuda de una molécula mediadora. En el 2001, la compañía Zytex desarrolló una formulación basada en un sistema lacasa-mediador, capaz de degradar el índigo en una ruta muy específica. El nombre comercial del producto es Zylite<sup>®</sup> (Rodríguez y Toca, 2007).

#### **2.3.3.3.3 Nanobiotecnología**

Dado que las lacasas son capaces de catalizar reacciones de transferencia de electrones sin la adición de cofactores, su uso también ha sido estudiado en biosensores, para detectar varios compuestos fenólicos u oxígeno. Por ello, biosensores para la detección de morfina y codeína, flavonoides vegetales y electroinmunoensayos, han sido desarrollados. La contribución de la nanotecnología es el desarrollo de más pequeños y más eficientes biosensores controlados por deposición y adsorción específica de biomoléculas en diferentes tipos de superficies, que van desde el orden de micras hasta nanómetros (Rodríguez y Toca, 2007).

#### **2.3.3.3.4 Biorremediación**

Uno de los mayores problemas ambientales que enfrenta el mundo hoy en día, es la contaminación del suelo, agua y aire, por compuestos químicos tóxicos (Desai y Nityanand, 2011). Con la rápida industrialización y el uso extensivo de pesticidas para mejorar la productividad agrícola, la contaminación ambiental se ha convertido en un serio problema. Ciertos compuestos peligrosos, como bifenilos policlorados, benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pentaclorofenol, 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano y trinitrotolueno, son sustancias conocidas por su efecto carcinogénico y mutagénico y por su persistencia en el medio ambiente

(Shraddha *et al.*, 2011). La capacidad de los hongos para transformar una amplia variedad de productos químicos peligrosos, ha causado gran interés en los investigadores para su uso en la biorremediación (Shraddha *et al.*, 2011).

La biorremediación es un concepto general que incluye aquéllos procesos y acciones que tienen lugar en la biotransformación en el medio ambiente; en este sentido, las lacasas son enzimas bien conocidas en la biorremediación, debido a su capacidad para degradar compuestos fenólicos (Minussi *et al.*, 2002).

Las lacasas pueden ser aplicadas en la degradación de plásticos que contaminan al tener unidades de olefina (Kunamneni *et al.*, 2006). También se pueden usar en la degradación de poliuretanos, en la eliminación de olores emitidos de basureros o plantas de celulosa, en la decoloración de aguas residuales de molinos de aceite de oliva y en los molinos de pulpa, por la remoción de compuestos fenólicos colorantes (Kunamneni *et al.*, 2006).

En la biorremediación de suelos, las lacasas oxidan contaminantes orgánicos tóxicos que, en conjunto con otros xenobióticos, son la principal fuente de contaminación del suelo. Normalmente se aplican en forma de micelio crecido sobre viruta de madera, paja de trigo o de maíz, o de algún otro material lignocelulósico similar (Quintero *et al.*, 2006).

En aguas de irrigación, la presencia de compuestos aromáticos, representa un riesgo significativo para la salud, por lo que el uso de lacasas inmovilizadas sobre soportes orgánicos, permite la remoción natural de los xenobióticos aromáticos de suspensiones acuosas (Minussi *et al.*, 2002).

#### **2.3.3.3.5 Cosméticos**

El ámbito de los cosméticos no ha sido indiferente a la aplicación de las lacasas ya que actualmente se conocen tintes capilares a base de estas enzimas que los hacen menos irritantes, pues las lacasas sustituyen el peróxido de hidrógeno como un

agente oxidante en la formulación de los tintes. Recientemente, también se han desarrollado preparaciones cosméticas y dermatológicas que contienen proteínas para el aclarado de la piel (Rodríguez y Toca, 2007).

#### **2.3.3.3.6 Alimentos**

En la industria alimentaria, las lacasas se utilizan para la eliminación de compuestos fenólicos indeseables en la elaboración de jugos, en la estabilización del vino y la biorremediación de aguas residuales. Las lacasas no sólo mejoran la funcionalidad, sino también las propiedades sensoriales del producto en el que se aplican (Minussi *et al.*, 2002; Rodríguez y Toca, 2007; Shraddha *et al.*, 2011).

En la industria de la cerveza, las lacasas no sólo proporcionan estabilidad, sino también alargan la vida útil de la misma. En esta bebida, la formación de turbidez es estimulada por las proantocianidinas presentes de forma natural, fenómeno que se conoce como “niebla fría”. A temperatura ambiente o superior, el calentamiento de la cerveza puede disolver el complejo, pero después de cierto tiempo, los anillos fenólicos son sustituidos por el grupo sulfhidrilo, y la turbidez entonces, se vuelve permanente, sin que se pueda redisolverse (Shraddha *et al.*, 2011).

En la elaboración de jugos frutales estables, la enzima lacasa es utilizada comúnmente, ya que los compuestos fenólicos y sus productos de oxidación confieren color y sabor no característico al jugo. El cambio en el color y aroma del jugo, se atribuye a la polimerización y oxidación de compuestos fenólicos y polifenoles, debido a que existe una alta concentración de estos compuestos; esta reacción se denomina oscurecimiento enzimático (Rodríguez y Toca, 2007).

El tratamiento de los jugos con lacasas, es más efectivo en comparación con los métodos convencionales, ya que permite la eliminación de fenoles, así como de complejos sustrato-enzima, con la ayuda de una membrana de filtración, logrando la estabilidad del color, a pesar de que la turbidez esté presente (Minussi *et al.*, 2002).

En el área de panificación, una amplia variedad de enzimas son usadas para mejorar la textura, volumen, sabor y frescura del pan. Cuando la lacasa se añade a la masa, la fuerza del gluten en la masa y en los productos de panadería, se mejora, pues el volumen del producto aumenta, se mejora la estructura de la miga y la suavidad de los productos horneados se lleva a cabo. Así mismo, debido a la adición de lacasa, la viscosidad disminuye y la resistencia y estabilidad aumentan, aun utilizando harinas de baja calidad (Minussi *et al.*, 2002; Rodríguez y Toca, 2007).

En la producción de vino, particularmente en la etapa de trituración y prensado de la uva, la alta concentración de compuestos fenólicos y polifenoles provenientes de los tallos, semillas y pieles de las bayas, desempeñan un papel importante, puesto que contribuyen al color y astringencia del vino. La oxidación de polifenoles ocurre tanto en mostos como en vinos, causando un aumento en el color y cambios en el sabor, lo que se denomina como “maderización”. Factores catalíticos, remoción de polifenoles, clarificación y altas dosis de dióxido de azufre, se utilizan para prevenir la maderización (Minussi *et al.*, 2002). Por lo tanto, el tratamiento con lacasa es factible, incrementa la capacidad de almacenamiento y reduce costos de procesamiento (Shraddha *et al.*, 2011).

## **2.4 Purificación de las enzimas**

La mayor parte de las investigaciones bioquímicas requieren la purificación, al menos parcial, de las sustancias objeto de estudio. Esto requiere generalmente un gran esfuerzo, ya que una célula contiene miles de sustancias diferentes, y la molécula que se busca, puede ser extremadamente inestable o encontrarse a concentraciones muy bajas. Por ello, es preciso aislar los constituyentes celulares diversos, identificarlos y estudiar sus estructuras y propiedades (Mathews *et al.*, 2002).

Para separar las moléculas, se aprovechan las diferencias que existen entre ellas, como solubilidad, tamaño, masa, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas (Mathews *et al.*, 2002).

El estudio de una proteína o enzima en cualquier sistema, incluyendo los medios de reacción no acuosos, requiere la purificación de ésta. El desarrollo de técnicas y métodos para la purificación de proteínas fue un pre-requisito esencial para muchos de los avances realizados en la biotecnología. La purificación de proteínas varía desde un simple paso de purificación por métodos de precipitación, hasta un proceso de purificación validado de gran escala. Más de un paso de purificación es necesario para obtener la pureza deseada. La clave del éxito para una eficiente purificación de proteínas, es seleccionar las técnicas más apropiadas, optimizar su resolución y combinar un camino lógico para maximizar rendimiento y minimizar el número de pasos requeridos (Janson y Rydén, 1998).

La mayoría de los esquemas de purificación incluyen alguna forma de cromatografía. Ésta ha resultado una herramienta esencial en laboratorios donde la purificación es necesaria. La disponibilidad de diferentes técnicas cromatográficas, con diferentes selectividades, provee una poderosa combinación para la purificación de cualquier biomolécula requerida (Janson y Rydén, 1998).

En seguida se detallan algunas de las técnicas más empleadas en la purificación de proteínas:

#### **2.4.1 Precipitación con sulfato de amonio**

Una de las formas más antiguas, simples y eficaces para llevar a cabo la separación de una mezcla de proteínas, es utilizar la solubilidad diferente en disoluciones salinas concentradas (Mathews *et al.*, 2002).

El sulfato de amonio es la sal que se emplea con frecuencia para llevar a cabo una precipitación selectiva, debido a que pueden conseguirse fuerzas iónicas altas sin dañar a las proteínas, además de que combina otras características útiles como: versatilidad de pH, alta solubilidad, disminuye la temperatura de la solución y tiene un precio relativamente económico (Bollag y Edelstein, 1991).

El fundamento de esta técnica se basa en un aumento de la fuerza iónica del medio (por adición de sulfato amónico), el cual provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan (salting out). En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible. Mediante una simple diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original. A veces es una disminución en la fuerza iónica la que provoca la precipitación. Así, las proteínas que se disuelven en medios salinos pueden desnaturalizarse al dializarlas frente a agua destilada, y se renaturalizan cuando se restaura la fuerza iónica original (Mathews *et al.*, 2002).

Diferentes proteínas precipitan a diferentes concentraciones de sal, por tal motivo el “salting out” es a menudo usado durante la purificación de proteínas. Es importante tomar en cuenta factores como pH, temperatura y la pureza de la proteína, ya que juegan papeles importantes para determinar el punto en que precipita una proteína particular (Bollag y Edelstein, 1991).

Este método fue empleado como primera etapa del proceso de purificación de la enzima lacasa producida por *Botrytis cinerea*, en donde primero se precipitaron del extracto crudo, proteínas contaminantes con 40 % de saturación de sulfato de amonio, las cuales se eliminaron por centrifugación y filtración, y posteriormente se precipitó la enzima lacasa de interés con el 80 % de saturación de sulfato de amonio (Pezet, 1998). Sin embargo, en el extracto crudo de *Ceriporiopsis subvermispota*, la lacasa de interés precipitó con un solo fraccionamiento de sulfato de amonio al 90 % de saturación (Fukushima y Kirk, 1995).

#### **2.4.2 Cromatografía de intercambio iónico**

Este tipo de cromatografía se utiliza para separar las moléculas de acuerdo con su carga eléctrica. Para ello se utilizan resinas de intercambio iónico, que son *polianiones*

(iones básicos con carga positiva) o *policationes* (iones ácidos con carga negativa), tal como se muestra en la Figura 5 (Mathews *et al.*, 2002).

Los intercambiadores iónicos son usualmente clasificados como fuertes y débiles, pero esto no indica la fuerza con que se adhieren las proteínas (Janson y Rydén, 1998).

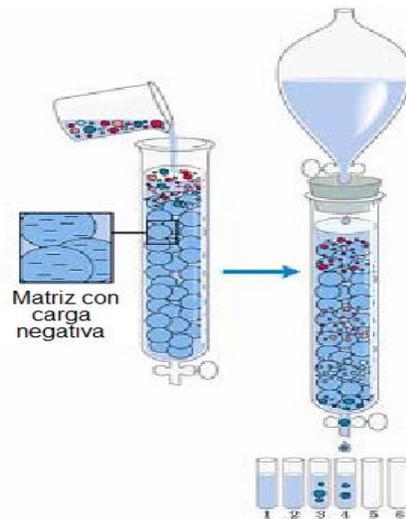


Figura 5. Principio de la cromatografía de intercambio iónico (Mathews *et al.*, 2002).

Por ejemplo: si se desea separar tres clases de moléculas, una de las cuales está cargada negativamente, otra con una carga positiva débil y la tercera con una carga positiva fuerte, se puede utilizar una resina aniónica, que lleva grupos cargados negativamente. Las moléculas de la mezcla cargadas negativamente pasarán a través de la columna sin adsorberse, y se encontrarán en las fracciones iniciales. Los dos tipos de moléculas con carga positiva serán ligados por la resina. Dado que los aumentos de concentración salina tienden a romper las interacciones electrostáticas de este tipo, se puede utilizar un gradiente salino una vez colectadas las primeras fracciones; es decir, se incrementa gradualmente la concentración salina de la solución eluyente (Mathews *et al.*, 2002). Una sal no amortiguadora, como NaCl, es usualmente adicionada al regulador para separar las proteínas del intercambiador iónico (Janson y Rydén, 1998). A medida que aumenta la concentración salina, los iones  $\text{Na}^+$  pueden competir cada vez mejor por los lugares negativos en la resina y por

lo tanto, eluirán los cationes con carga débil y los fijados con fuerte carga positiva sólo eluirán con la concentración salina más elevada (Mathews *et al.*, 2002).

### 2.4.3 Cromatografía por filtración en gel

La separación de solutos por su peso molecular, también llamada filtración en gel cuando se usan soluciones acuosas y permeación en gel cuando usan disolventes orgánicos (Fischer, 1980), fue dada a conocer alrededor de 1940, pero la primera separación por peso molecular de biomoléculas fue en 1955.

En esta técnica, la fase estacionaria está constituida por partículas de polímeros de diferente porosidad. La separación se basa en el tamaño de las partículas, de manera que las proteínas más grandes, las cuales no pueden penetrar en los poros de las partículas de la matriz de filtración, son eluidas con más rapidez que las proteínas más pequeñas, que penetran por los poros de las partículas y siguen un camino más tortuoso y más largo (Figura 6). El tamaño de los poros internos, depende de la naturaleza del polímero en cuestión, y permite la entrada a proteínas por debajo de un determinado peso molecular (Hagel y Janson, 1992).

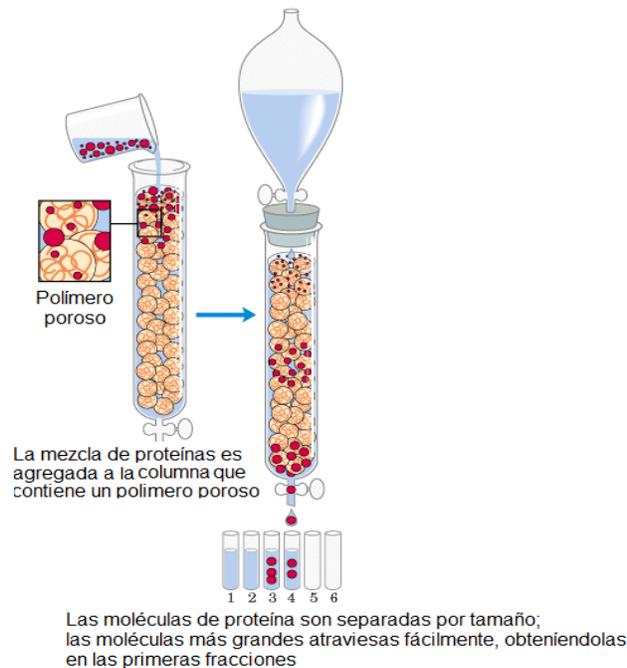


Figura 6. Esquema de la cromatografía de filtración en gel (Mathews *et al.*, 2002).

#### 2.4.4 Métodos electroforéticos

Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución, las moléculas de soluto con carga positiva se desplazan hacia el cátodo, y las moléculas con carga neta negativa se desplazan hacia el ánodo. Este desplazamiento se denomina *electroforesis*, pero cuando ésta se realiza en un gel o en otro medio de soporte, se presenta un efecto de tamizado molecular (Mathews *et al.*, 2002).

Para comprobar si la proteína de interés se ha separado del resto, es decir si la proteína está pura, se requieren las técnicas electroforéticas. La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles de poliacrilamida. Se trata de geles porosos cuya porosidad se puede regular en función de la concentración de acrilamida. Durante la electroforesis, la fuerza que provoca la migración de las proteínas es un campo eléctrico, y el gel actúa como filtro molecular, logrando la migración de las proteínas en función de su relación carga/masa. A diferencia de lo que ocurre en la cromatografía de filtración, en la electroforesis, las proteínas mayores son retardadas y se mueven más lentamente a través del gel, ya que las va frenando el tamaño del poro y las proteínas más pequeñas avanzan más rápidamente (Medina, 2003).

Existen dos tipos principales de electroforesis: en condiciones *nativas*, las proteínas se separan en función de su carga/masa; y en condiciones *desnaturalizantes*, la electroforesis se realiza en presencia de un detergente, el SDS (dodecil sulfato sódico). El SDS es un detergente aniónico, que se une a todas las proteínas en la misma proporción, formando una especie de micela cargada negativamente. La gran carga negativa del SDS enmascara la carga intrínseca de las proteínas, con lo que éstas se separan sólo en función de su masa e independientemente de su carga. El único inconveniente de esta técnica es que el SDS desnaturaliza las proteínas y las proteínas multiméricas se separan en sus subunidades. Las electroforesis en SDS, además de permitir calcular el peso molecular de las cadenas polipeptídicas, indican las distintas subunidades que posee la proteína (Medina, 2003). En la Figura 7, se

puede apreciar la diferencia, en cuanto a la aparición de bandas, entre un gel nativo y un desnaturante.

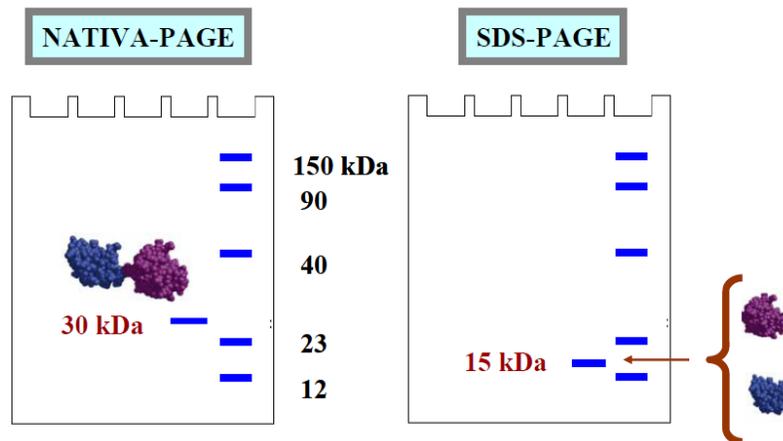


Figura 7. Diferencia entre la electroforesis nativa (NATIVA-PAGE) y electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) (Medina, 2003).

## 2.5 Caracterización de las enzimas

La cinética, es el estudio de la velocidad a la que tienen lugar las reacciones químicas. La velocidad de una reacción y la forma en que cambia esta velocidad en respuesta a diferentes condiciones, están íntimamente ligadas a la ruta seguida por la reacción y es, por consiguiente, indicativa de su mecanismo de reacción. La cinética enzimática es un tema de gran importancia en bioquímica según Voet y Voet (1990), dado que:

- Mediante estudios cinéticos, se pueden determinar las afinidades de fijación de sustratos e inhibidores a una enzima; a su vez, se puede establecer la máxima tasa catalítica de una enzima.
- Observando la forma en que varía la velocidad de una reacción enzimática, con las condiciones de reacción y, combinando esta información con la obtenida a partir de estudios químicos y estructurales de la enzima, se puede elucidar el mecanismo catalítico de la enzima.
- El estudio de la cinética de una reacción enzimática, conduce a un conocimiento sobre el papel de la enzima en un proceso metabólico global.

- La determinación de las velocidades de reacciones catalizadas enzimáticamente, se encuentran entre los procedimientos más utilizados en análisis bioquímico y clínico.

### **2.5.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

La mayoría de las enzimas, poseen un pH característico al cual su actividad es máxima; por arriba o por debajo de ese pH, la actividad disminuye. Aunque los perfiles de las curvas de actividad en función del pH de muchas enzimas tienen forma de campana, pueden variar considerablemente de forma. La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima, depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato, así como de otros factores que, en general, son difíciles de analizar cuantitativamente. La forma de la curva actividad-pH varía con la concentración del sustrato, ya que el valor de  $K_M$  también varía con el pH en varias enzimas. El pH óptimo de una enzima, no es necesariamente igual al de su entorno; por lo tanto, este es un factor de control de la actividad enzimática (Muñoz *et al.*, 1997; Medina, 2003).

### **2.5.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática**

Al igual que para la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, se incrementa en general, con la temperatura, dentro del intervalo en el que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La velocidad de muchas reacciones se duplica aproximadamente por cada 10 °C de aumento de la temperatura, sin embargo, el coeficiente de temperatura varía de una enzima a otra, según la energía de activación de la reacción catalizada; es decir, de la altura de la barrera de energía para pasar al estado de transición, aunque las reacciones catalizadas por las enzimas poseen una temperatura óptima resultante de dos procesos: (1) el incremento de la velocidad de reacción con la temperatura y, (2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima, al sobrepasar una temperatura crítica. Gran parte de las enzimas se inactivan a temperaturas comprendidas entre 55 y 60 °C, pero existen algunas que son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas superiores (Muñoz *et al.*, 1997; Medina, 2003).

### 2.5.3 Constantes cinéticas enzimáticas

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, pero éstas muestran un rasgo característico que no se observa en las reacciones no enzimáticas: la saturación por el sustrato. A una concentración baja de sustrato, la velocidad inicial de la reacción ( $V_o$ ) es casi proporcional a la concentración de sustrato, y la reacción por lo tanto es aproximadamente de primer orden. Sin embargo, a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial ( $V_o$ ) de la reacción, disminuye y deja de ser aproximadamente proporcional a la concentración de sustrato; en esta zona, el orden de reacción es mixto. Con un aumento posterior de la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones de sustrato, la reacción es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato, y se dice que la enzima se halla saturada por su sustrato. Las concentraciones de sustrato que se requieren para saturar a la enzima, varían ampliamente entre el tipo de enzima y aún entre enzimas homólogas que provienen de diversas fuentes. El efecto de saturación condujo a J. Brown y a V. Henry, a formular la hipótesis de que la enzima y el sustrato, reaccionan reversiblemente para formar un complejo, como etapa esencial en la reacción catalizada (Acunzo y Galli, 2003; García *et al.*, 2003).

L. Michaelis y M. L. Menten, desarrollaron en 1913, una teoría general acerca de la acción y cinética de las enzimas, la cual fue ampliada posteriormente por G. E. Briggs y J. B. S. Haldane. La teoría de Michaelis–Menten supone que la enzima [E] se combina en primer lugar con el sustrato [S] para formar el complejo enzima-sustrato [ES]; a continuación, este último se escinde en una segunda etapa, para formar a la enzima libre [E] y producto [P], como se muestra en la Figura 8 (Acunzo y Galli, 2003; Xu *et al.*, 2000).

La ecuación de Michaelis–Menten expresa la relación matemática entre la velocidad lineal de una reacción catalizada por una enzima, la concentración del sustrato y

ciertas características de la enzima. La ecuación de Michaelis–Menten es la ecuación de velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas que solo actúan sobre un sustrato. En la deducción debida a Briggs y Haldane,  $[E]$  representa la concentración de la enzima libre o no combinada,  $[ES]$  es la concentración del complejo enzima-sustrato, y  $[E_t]$  es la concentración total de la enzima (suma de las formas libre y combinada). La concentración del sustrato se representa por  $[S]$ , la cual se supone que es mucho mayor que  $[E]$ , de modo que la cantidad de  $[S]$  unida a  $[E]$  en cualquier instante, es despreciable si se compara con la concentración total de  $[S]$  (Acunzo y Galli, 2003).



Figura 8. Representación del modelo enzimático de llave-cerradura (Mathews *et al.*, 2002).

Las dos magnitudes que caracterizan a una enzima que obedezca la cinética de Michaelis–Menten son  $K_M$  y  $k_{cat}$ . La primera, se define como la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción alcanza la mitad de su valor máximo. Así pues,  $K_M$  es una medida de la concentración de sustrato necesaria para que se produzca una catálisis eficaz. Una enzima con una  $K_M$  alta, requiere una concentración de sustrato mayor para alcanzar una velocidad de reacción dada, que una enzima con una baja  $K_M$ . Las dimensiones de  $K_M$  para una reacción de un solo sustrato, son  $\text{mol litro}^{-1}$ , y la constante es independiente de la concentración de la enzima (Mathew *et al.*, 2002; Acunzo y Galli, 2003).

Una aproximación al valor de  $K_M$  puede obtenerse con facilidad, a partir de una serie de experimentos sencillos en los que la velocidad inicial de la reacción se mide a diferentes concentraciones iniciales de sustrato, con una concentración de enzima

constante. El valor aproximado de  $K_M$  se obtiene gráficamente, al representar la velocidad inicial frente a la concentración inicial del sustrato, que sigue una función hipérbola rectangular, como se ilustra en la Figura 9. A concentraciones de sustrato muy bajas, la velocidad inicial ( $V_o$ ) es proporcional a la  $[S]$ ; la reacción muestra esencialmente un comportamiento de primer orden. A concentraciones de sustrato muy elevadas, la velocidad de la reacción se aproxima asintóticamente a la  $V_{max}$  y es de orden cero, o prácticamente independiente de la concentración del sustrato (García *et al.*, 2003).

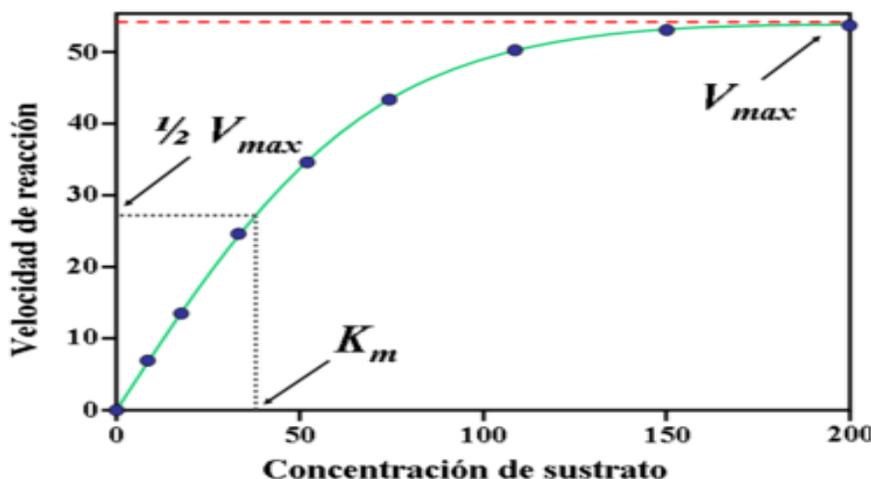


Figura 9. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción (Mathews *et al.*, 2002).

La constante  $K_M$  no es un valor fijo, sino que puede variar con la estructura del sustrato, con el pH y con la temperatura, de igual forma varía la  $V_{max}$  para cada reacción catalizada enzimáticamente. La constante de Michaelis de una enzima constituye una característica útil e importante que es fundamental para la descripción de la cinética enzimática y para la determinación cuantitativa de la actividad de la enzima (Xu *et al.*, 2000).

La segunda constante,  $k_{cat}$ , constituye una medida directa de la producción catalítica de producto en condiciones óptimas (enzima saturada). Las unidades de esta constante son  $s^{-1}$ , por lo que el recíproco de  $k_{cat}$  puede interpretarse como el tiempo necesario para que una molécula de enzima “recambie” una molécula de sustrato.

Otra posibilidad es interpretar  $k_{cat}$  como el número de moléculas de sustrato recambiadas por molécula de enzima por segundo. Así pues,  $k_{cat}$  se denomina a veces *número de recambio*; un valor grande de esta constante significa un recambio rápido (Mathews *et al.*, 2002).

No obstante, los parámetros cinéticos ( $K_M$ ,  $V_{max}$  y  $k_{cat}$ ), son susceptibles de variar en función del pH, la temperatura, el sustrato utilizado, los métodos de purificación empleados, la concentración de enzima y la especie fúngica (Castro, 2005).

En una reacción catalizada por enzimas, la termodinámica no aporta información suficiente acerca de las velocidades de reacción, ya que se generaliza el progreso de la reacción a través de los estados intermedios. Así, en la Figura 10 se puede observar que la energía libre del estado estándar de los productos, es inferior a la de los reactantes. Sin embargo, lo que puede ser más importante para determinar la velocidad de reacción, es lo que ocurre en el estado de *transición* desde los reactantes a los productos. El estado de transición (simbolizado con  $\ddagger$ ) es una fase a través de la cual deben pasar las moléculas que reaccionan, de forma que la molécula se encuentre tensionada o distorsionada o tenga una estructura electrónica determinada, o en que las moléculas colisionen adecuadamente (Mathews *et al.*, 2002).

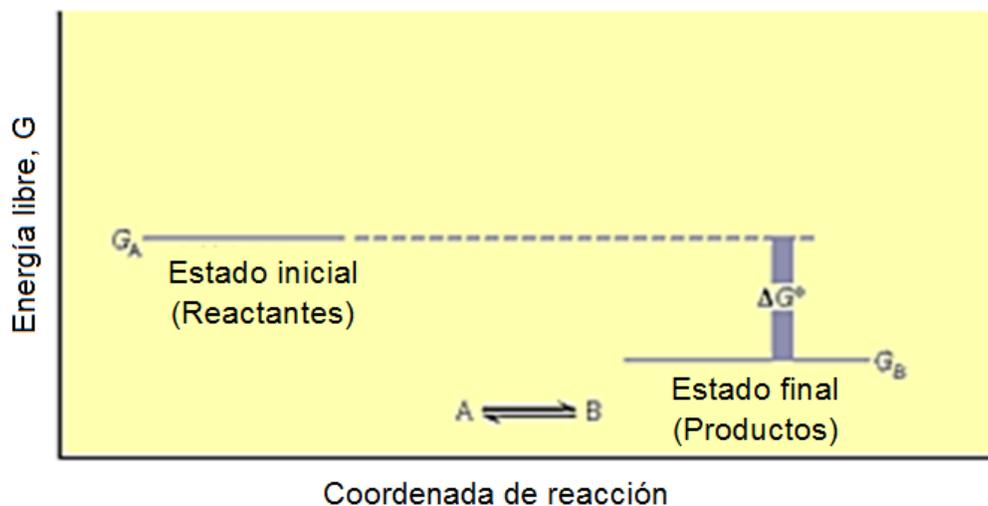


Figura 10. Diagrama de energía libre para la reacción simple  $A \rightleftharpoons B$  (Mathews *et al.*, 2002).



presencia o no del catalizador (Figura 12), mas no así en estado de transición, donde el catalizador afecta directamente la altura de la barrera energética; de ahí la importancia de considerar la termodinámica en el estado de transición.

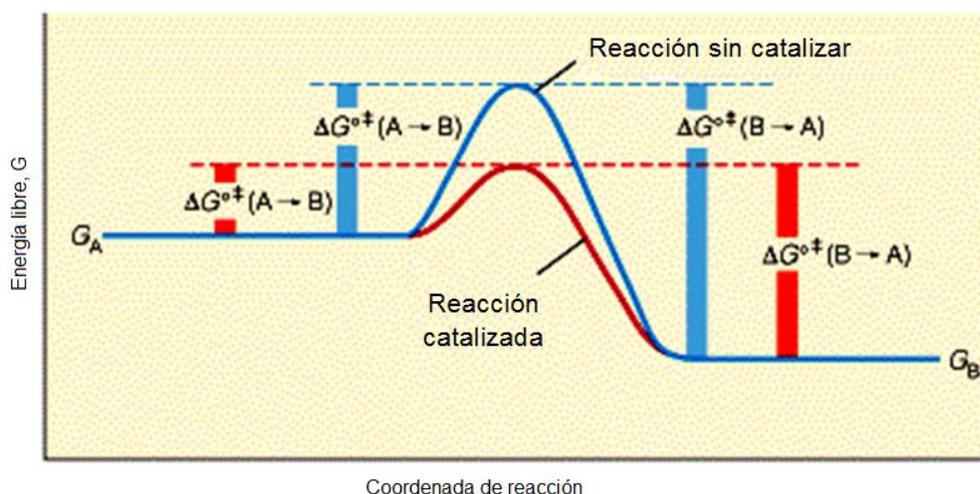


Figura 12. Efecto de un catalizador sobre la energía de activación (Mathews *et al.*, 2002).

### 2.5.3.1 Teoría de la velocidad de reacción absoluta

La ecuación empírica de Arrhenius y la ecuación de la teoría de la colisión, no son completamente adecuadas para explicar todas las observaciones experimentales concernientes al efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción (Whitaker, 1972).

De acuerdo a la teoría de la velocidad de reacción absoluta (teoría del estado de transición), la energía de los reactantes (A) debe aumentar hasta tener la energía suficiente para estar en la cima del pico como  $A^\ddagger$  (Figura 13). Para que los reactantes sean convertidos a producto (P), deben alcanzar una determinada cantidad de energía para convertirse en  $A^\ddagger$ . Las moléculas de A con menos de esa cantidad de energía, se deslizarán hacia abajo del pico. Esto implica entonces, un equilibrio entre las moléculas que escalan a la cima del pico y aquéllas que caen (Whitaker, 1972). Así, todas las moléculas, una vez que son forzadas a formar producto (por ejemplo se

encuentran en forma  $A^\ddagger$ ), lo hacen a un velocidad independiente de la temperatura y naturaleza de la molécula. Por lo tanto, la velocidad de la reacción se puede escribir:

$$k = Mk^\ddagger = M \frac{(A^\ddagger)_{eq}}{(A)_{eq}} = M \frac{k_1}{k_{-1}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde  $M$  es una constante de proporcionalidad y  $k^\ddagger$  es una constante de equilibrio (Whitaker, 1972).

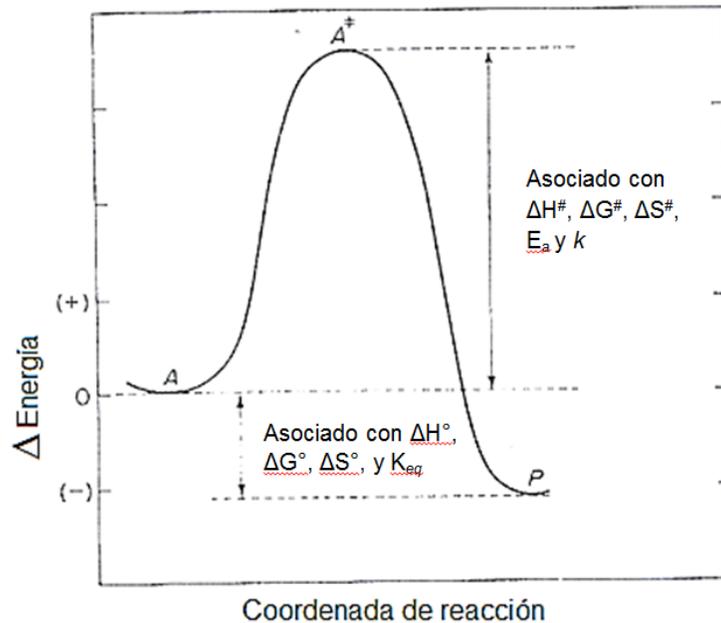


Figura 13. Cambio de la energía de la reacción durante la conversión de reactante A, a producto P, de acuerdo a la teoría de la velocidad de reacción absoluta.  $A^\ddagger$  indica las moléculas activadas que son intermediarias en la conversión de A a P (Whitaker, 1972).

En analogía con las leyes de termodinámica para las moléculas sin activar, se puede definir una expresión para el estado de transición (Whitaker, 1972):

$$K^\ddagger = \frac{(A^\ddagger)_{eq}}{(A)_{eq}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad \text{Ecuación (2)}$$

En base a la teoría de la velocidad de reacción absoluta,  $M$  tiene la definición de  $RT/Nh = k_B T/h$ , donde  $R$  es la constante universal de los gases ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $N$  es el número de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas mol}^{-1}$ ),  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34} \text{ J*s}$ ) y  $k_B (= R/N)$  es la constante de Boltzmann ( $1.381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ). Así, la Ecuación (1) se puede escribir como lo enuncia Whitaker (1972):

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\# / RT} \quad \text{Ecuación (3)}$$

La cual se puede reordenar a la forma:

$$\Delta G^\# = -RT \ln \frac{kh}{k_B T} \quad \text{Ecuación (4)}$$

Para determinar  $\Delta H^\#$ , la representación de  $\log k$  frente a  $1/T$ , proporciona la energía de activación ( $E_a$ ) pero no  $\Delta H^\#$ . Sin embargo, ambos términos se relacionan en la siguiente expresión reportada por Whitaker, (1972):

$$E_a = \Delta H^\# + RT \quad \text{Ecuación (5)}$$

Teniendo  $\Delta H^\#$  y  $\Delta G^\#$ , se puede calcular entonces  $\Delta S^\#$ :

$$\Delta S^\# = \frac{\Delta H^\# - \Delta G^\#}{T} \quad \text{Ecuación (6)}$$

## 2.6 *Agave tequilana* Weber

El género *Agave* contiene 140 especies, las cuales constituyen la mayor parte de la familia Agavaceae. Son cultivadas en regiones áridas y semiáridas de todo el mundo (Parra y Macías, 2005) y se caracterizan por presentar un metabolismo ácido crasuláceo (MAC), que es responsable en gran parte, de los extremadamente bajos requerimientos hídricos de la planta (Nobel y Valenzuela, 1987).

El *Agave tequilana* Weber, o agave azul, es una planta nativa de México, de gran importancia económica debido a que es la única especie apropiada para la producción de tequila. La cabeza o “piña” de la planta, posee una alta concentración de inulina, polímero lineal de fructosa que se hidroliza en azúcares fermentables usados para la elaboración de la bebida alcohólica (Bousios *et al.*, 2007; Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001). La clasificación botánica del *A. tequilana* Weber se presenta en el Cuadro 3.

Parra y Macías (2005), así como Iñiguez-Covarrubias *et al.*, (2001), describen al *A. tequilana* Weber como una planta carnosa, en forma de roseta, con aproximadamente 50 pencas. Sus hojas miden de 90-120 cm de longitud y 8-12 cm de ancho, son lanceoladas, puntiagudas, fibrosas, rígidas, cóncavas, con ascendencia horizontal, gruesas en la base y generalmente azuladas a verde-grisáceas con espinas marginales y apicales (Figura 14).

Cuadro 3. Clasificación botánica de *Agave tequilana* Weber

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Agavaceae
Género	<i>Agave</i>
Especie	<i>tequilana</i>

Fuente: Bousios *et al.*, 2007

Los fructanos (carbohidratos no reductores constituidos de unidades fructosilo con una glucosa terminal), también son compuestos importantes del agave, los cuales se han usado como prebióticos gracias a que favorecen el crecimiento de la flora natural del colon. No pueden ser degradados por enzimas humanas pero sí por enzimas bacterianas, produciendo ácidos grasos de cadena corta, lactato y gases (Urias y López, 2004).

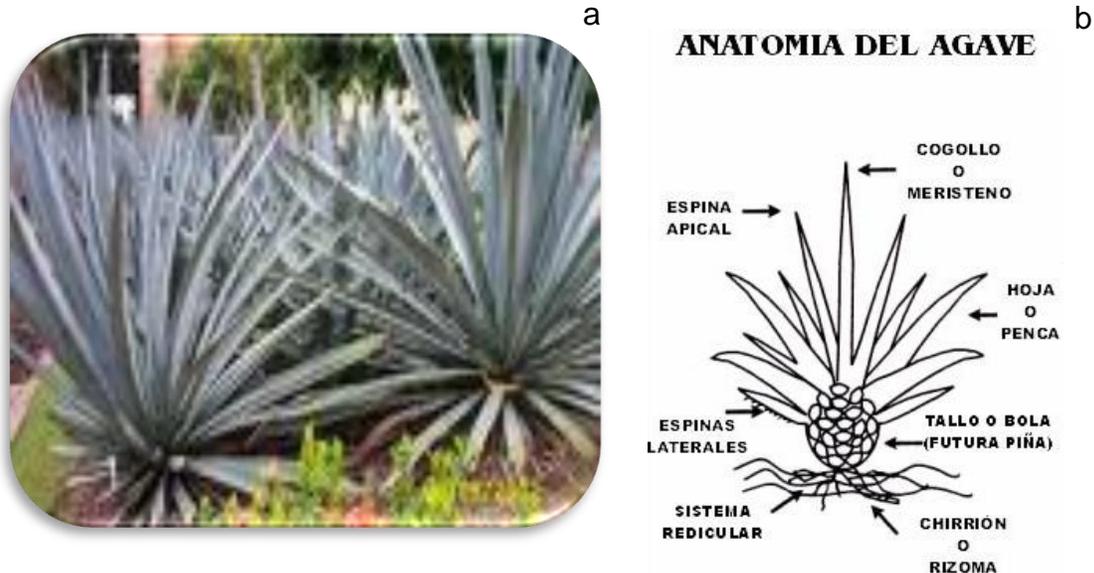


Figura 14. Fotografía del *Agave tequilana* Weber (a) y anatomía de la planta (b).

El maguey tequilero requiere de 8 a 12 años de edad para llegar a su madurez; en ese momento es despojado de sus pencas para cosechar la piña, en tanto que el resto de la planta (principalmente hojas) es abandonada en los campos sin darle utilidad alguna (Enríquez, 1981).

Iñiguez-Covarrubias *et al.*, (2001) reportan que del peso húmedo total del agave, el 54% corresponde a la cabeza de la planta, el 32 % corresponde a materiales que pueden ser utilizables para la producción de azúcares y fibra y que provienen de las bases de la hoja remantes en la cabeza después de la jima, así como de la base de la planta, y el 14 % restante, corresponde a las hojas cortadas durante la cosecha de la piña.

Las características del material fibroso del *A. tequilana* Weber, de acuerdo con Enríquez (1981) y Balam y colaboradores (2006) son:

- Celulosa: 64.8 %
- Hemicelulosa: 5.1%
- Lignina: 15.9 %

Materiales extraíbles: 14 %

Cenizas: 1%

Cabe mencionar que el *A. tequilana* Weber es cultivado únicamente en los estados con denominación de origen. Estos estados incluyen a Nayarit (8 municipios), Guanajuato (6 municipios), Michoacán (29 municipios), Tamaulipas (12 municipios) y Jalisco. Éste último produce el 90 % del total de tequila, pues cuenta con una superficie cultivada de agave de más de 48 200 hectáreas (Iñiguez-Covarrubias et al., 2001) que generan cerca de un millón de toneladas de agave anualmente, mismos que se procesan para la producción de tequila (Parra y Macías, 2005).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El uso potencial de las lacasas en la biotecnología, ha estimulado la necesidad de buscar alternativas de sustrato, para el crecimiento de varias especies de hongos de la podredumbre blanca, que permitan obtener altas cantidades de lacasa con ventajas biotecnológicas.

Los residuos agroindustriales, han mostrado un gran potencial para actuar como sustrato para la alta producción de lacasa (Desai y Natyaland, 2011). De igual manera, el uso de dichos residuos lignocelulósicos, constituyen una manera efectiva para reducir los costos de producción de la enzima, al mismo tiempo que se les da un aprovechamiento eficiente.

Sin embargo, los residuos generados durante la cosecha del *Agave tequilana* Weber para la producción de tequila, y su uso como sustrato natural, sin la adición de inductores para aumentar la producción de lacasa, no se ha investigado, lo que representa una alternativa potencial, ecológica, sostenible y económica, para el aprovechamiento de estos desechos, tomando en cuenta además, que aproximadamente un millón de toneladas de agave se producen y procesan anualmente para la elaboración de tequila, proceso en el cual la única estructura

industrialmente útil es la llamada piña, en tanto que las penca cortadas, son abandonadas sobre los campos sin darles un uso importante.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. General

- Producir lacasa de *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

### 4.2. Particulares

- Seleccionar un hongo ligninolítico de un total de cinco cepas fúngicas, de acuerdo a su producción de lacasa.
- Determinar el tiempo óptimo de máxima producción de lacasa de *P. ostreatus* en fermentación sumergida, utilizando fibra y penca seca de *Agave tequilana* Weber como sustrato.
- Determinar el efecto de la concentración de fibra y penca seca de *Agave tequilana* Weber, sobre la producción de lacasa de *P. ostreatus* en fermentación sumergida.
- Determinar el efecto de la composición del medio sobre la producción de lacasa de *P. ostreatus* en fermentación sumergida, utilizando fibra y penca seca de *Agave tequilana* Weber como sustrato.
- Determinar la producción de lacasas de *P. ostreatus* en fermentación sólida, utilizando fibra y penca seca de *Agave tequilana* Weber como sustrato.
- Seleccionar el mejor tratamiento y presentación del agave, para la máxima producción de lacasa.
- Escalar la producción de lacasa a nivel matraz y biorreactor.
- Purificar parcialmente la lacasa producidas por el hongo.
- Determinar el pH, temperatura óptima, así como los parámetros cinéticos de la lacasa parcialmente purificada.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 15, se ilustra la estrategia experimental para el desarrollo del proyecto, la cual se conformó de 5 etapas fundamentales: 1) seleccionar la cepa fúngica de mayor actividad lacasa; 2) realizar cinéticas de producción enzimática en fermentación líquida y sólida, para seleccionar el sistema de mayor producción de lacasa; 3) escalar a nivel de matraz y biorreactor la producción de lacasa; 4) purificar parcialmente la enzima producida y 5) caracterizar la lacasa.

### 5.1 Cepas fúngicas

Para esta investigación se utilizaron 5 hongos diferentes. Tres de ellos fueron hongos no identificados y aislados de un reactor utilizado para la oxidación de manganeso; el resto fueron hongos de la podredumbre blanca que correspondieron a *Trametes versicolor* y *P. ostreatus*; ambos, donados por el laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia.

#### 5.1.1 Reactivación de cepas fúngicas

La reactivación de las cepas fúngicas se realizó en cajas Petri con medio de cultivo selectivo Agar Rosa de Bengala (J.T. Baker) a 29 °C durante 8 días. Al término de este tiempo, cada una de las cepas se resembró en medio sólido con agar extracto de salvado de trigo y se incubaron a 29 °C por 8 días. La composición del medio agar extracto de salvado de trigo fue: 175 g L<sup>-1</sup> de salvado de trigo natural (marca Maxilu), 10 g L<sup>-1</sup> de glucosa (J.T. Baker), 5.0 g L<sup>-1</sup> de peptona de caseína (Bioxon), 2.0 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura (Bioxon), 0.1 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Mallinkrodt), 0.05 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Mallinkrodt), 0.076 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub> (Mallinkrodt), 18.0 g L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico (Bioxon) y 0.1 g L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Merck)].

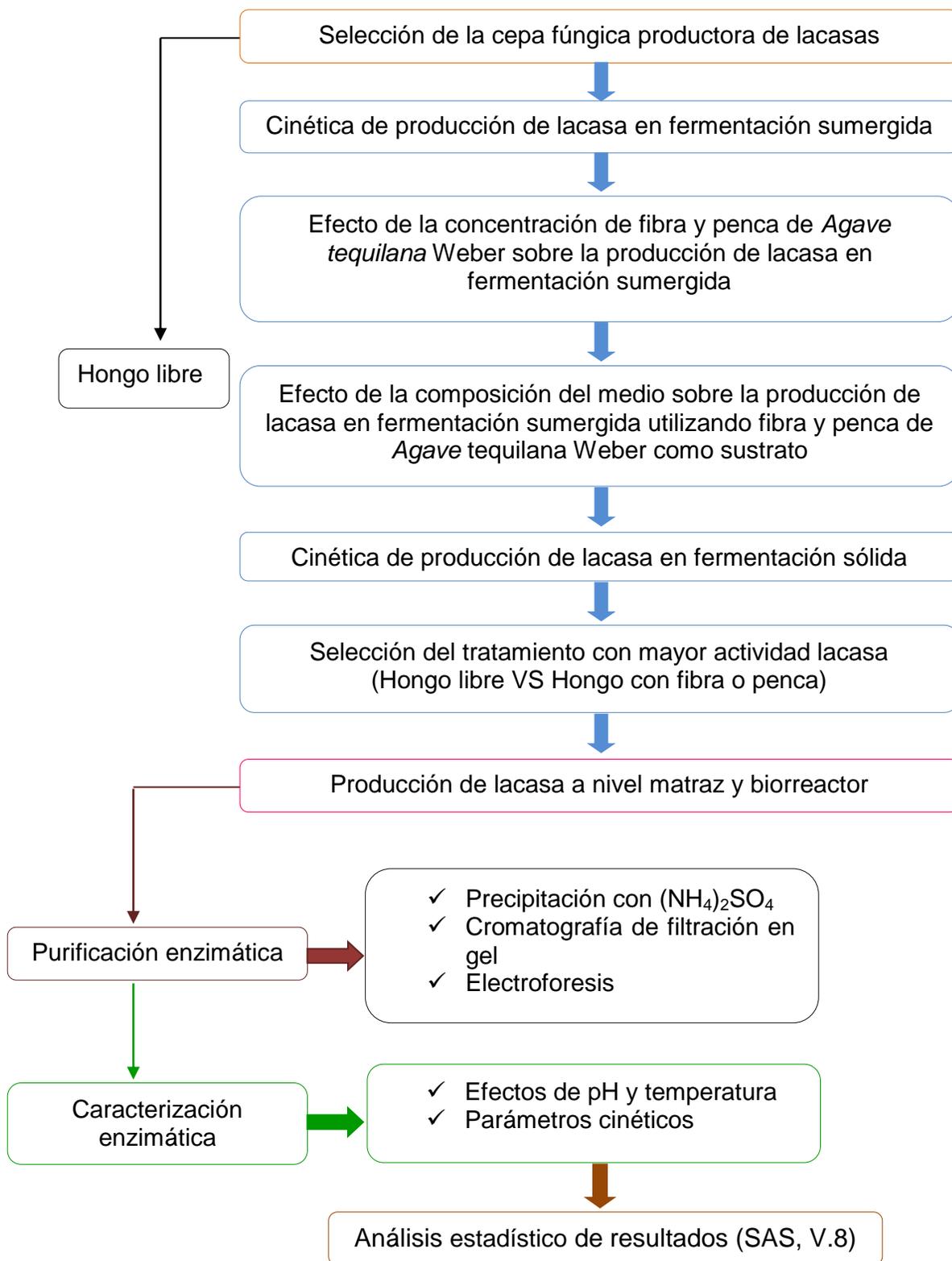


Figura 15. Estrategia experimental desarrollada para la producción de lacasa de *P. ostreatus*, utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

## **5.2 Preparación del inóculo fúngico**

En el caso de la fermentación sumergida (FESUM), el inóculo se obtuvo resemebrando un disco con micelio tomado del centro de la caja de Petri, con micelio crecido sobre agar extracto de salvado de trigo durante 8 días, en una caja nueva que contenía también agar extracto de salvado de trigo. Las placas con el inóculo sembrado, se incubaron a 29 °C por 8 días.

Para la fermentación en estado sólido (FES), el inóculo se preparó en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 200 mL de medio extracto de salvado de trigo pero sin agar. Este medio se inoculó con 40 discos con micelio, los cuales fueron tomados del centro y periferia del micelio desarrollado sobre placas con agar extracto de salvado de trigo durante 8 días, utilizando puntas estériles para micropipeta (5 mm de diámetro) para marcar los discos sobre el agar, y una pinza de disección, también estéril, para tomar los discos de la caja y depositarlos en los matraces que contenían el medio de cultivo. Los matraces se incubaron en la oscuridad a 29 °C, por 5 días, sobre un agitador rotatorio a 130 rpm. Al final de este tiempo, el medio de cultivo se filtró con vacío para recuperar la biomasa producida (inóculo fúngico), la cual se lavó masivamente con agua destilada estéril para eliminar el exceso de medio de cultivo y agar.

## **5.3 Acondicionamiento de las pencas de *Agave tequilana* Weber**

Las pencas de *Agave tequilana* Weber se obtuvieron en el municipio de Tequila, Jalisco, México, de agaves entre los 8 y 10 años de edad. A una parte de las pencas se le desprendieron las espinas, se lavaron con agua potable, se cortaron en pequeños cuadros (0.5 x 0.5 cm) con un cuchillo, se secaron a 60 °C en una estufa hasta peso constante y se empacaron en bolsas de polietileno en cantidades de 0.5 g.

El resto de las pencas, se utilizaron para la producción de fibra, de acuerdo a métodos rústicos empleados por los artesanos del estado de Hidalgo para la obtención de fibras de lechuguilla y del maguey pulquero (comunicación personal), que consisten en la remoción de la parte carnosa de las pencas usando un instrumento punzante

(carda) para exponer y remover la fibra. Después, la fibra se enjuagó con agua potable y se secó al sol durante 3 días. La fibra obtenida, se cortó en pequeñas fracciones de 0.5 cm de longitud que se empacaron en bolsas de polietileno en cantidades de 0.5 g.

Tanto las bolsas con penca como con fibra (Figura 16), se esterilizaron con irradiación gamma ( $^{60}\text{Co}$ ), a un intervalo de dosis de 21 a 38 kGy, en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares de México (ININ).



Figura 16. Fotografía de la fibra (a) y penca (b) de *Agave tequilana* Weber empacada en bolsas de polietileno.

#### 5.4 Selección de la cepa productora de lacasas

Para la selección de la cepa fúngica productora de la mayor cantidad de lacasa, se evaluó la producción de la enzima en fermentación sumergida (FESUM), en matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales contenían 1 g de fibra seca y estéril como sustrato, 10 discos con micelio tomados de las cajas con micelio crecido sobre agar extracto de salvado de trigo por 8 días, glucosa ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ) y 50 mL de medio mineral estéril (MME) (Radha *et al.*, 2005), compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $2.0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $0.03 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ), tiamina ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) y solución de elementos traza ( $10 \text{ mL L}^{-1}$  de medio), constituida por  $\text{MnSO}_4$  ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ).

Los matraces se incubaron en oscuridad a una temperatura de 29 °C y agitación constante, a 120 rpm, durante 168 h. Al cabo de este tiempo, el extracto enzimático se centrifugó durante 20 min a 3 500 rpm (1 373 g) y se determinó la actividad lacasa para seleccionar la cepa de mayor producción de la enzima.

### 5.5 Actividad lacasa

La actividad enzimática se determinó midiendo la oxidación del ABTS (2,2-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]) (Sigma A188) a 436 nm por 3 minutos, con un volumen de reacción de 1 mL (Tinoco *et al.*, 2001). Para esto se tomaron 0.1 mL de regulador acetato de sodio 100 mM, pH 4.5, 0.8 mL del extracto enzimático y 0.1 mL de ABTS 5 mM.

La temperatura de reacción fue de 20 °C ± 2 y se tomó la absorbencia al inicio y tres minutos después de la reacción en un espectrofotómetro Marca Hach modelo DR 5000. La actividad lacasa se obtuvo con la ecuación 1, usando una absortividad molar del ABTS de  $\epsilon_{436}$  29 300 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

$$UL^{-1} = \frac{\text{Absorbencia}}{29300 * 0.8 * \text{Tiempo Re accion}} * 1000000 * \frac{1}{Fd} \quad \text{Ecuación (7)}$$

Donde:

U L<sup>-1</sup>= Unidades de lacasa por litro. Una unidad de lacasa se define como un micromol de ABTS oxidado por minuto por litro de extracto.

$\epsilon_{436}$ = 29,300 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>= Coeficiente de absortividad molar del ABTS

Absorbencia= Diferencia de absorbencias final e inicial

Tiempo de reacción= 3 minutos

Fd= Factor de dilución

0.8= Volumen de extracto utilizado

## 5.6 Determinación de proteína

Este ensayo se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976), cuyo principio implica el enlace del azul brillante de Coomasie G-250 con las proteínas, originando un complejo colorido que se lee a 595 nm. Esta unión es independiente de la composición de aminoácidos de las proteínas. El enlace del colorante a la proteína es muy rápido (aproximadamente 2 minutos), con una estabilidad de hasta 1 h. Los detergentes comerciales pueden interferir en el color.

La determinación de proteína se hizo por triplicado, y se utilizó 1 mL del extracto enzimático y 3.0 mL del reactivo de Bradford. Se preparó un testigo al cual no se le agregó extracto, únicamente 1.0 mL de agua destilada y 3.0 mL del reactivo de Bradford. Los tubos se agitaron y se mantuvieron en reposo por 10 min a temperatura ambiente y oscuridad, y después se leyeron a 595 nm usando el testigo para ajustar. De los datos que se obtuvieron se calculó la media aritmética y se interpolaron en la curva tipo de una solución de suero bovino para obtener la concentración de proteína de los extractos.

El reactivo de Bradford se preparó usando 10 mg de azul de Coomasie G-250 (Sigma) con 10 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85 % (J.T. Baker) y 4.7 mL de etanol (J.T. Baker) y se aforó hasta un volumen total de 100 mL. La solución se filtró y se conservó en oscuridad y refrigeración hasta su uso; por otro lado, la curva tipo se construyó con una solución de suero bovino a una concentración inicial de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Después, en una serie de tubos se colocaron 0.0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 y 0.50 mL de la solución de suero bovino y se llevó a un volumen de 1.0 mL con agua destilada, para obtener concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; enseguida, se añadieron 3.0 mL del reactivo Bradford, se agitaron y mantuvieron en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad y, finalmente, se tomó la lectura a 595 nm usando el testigo para ajustar. Con ello se obtuvo la curva tipo que se muestra en la Figura 17.

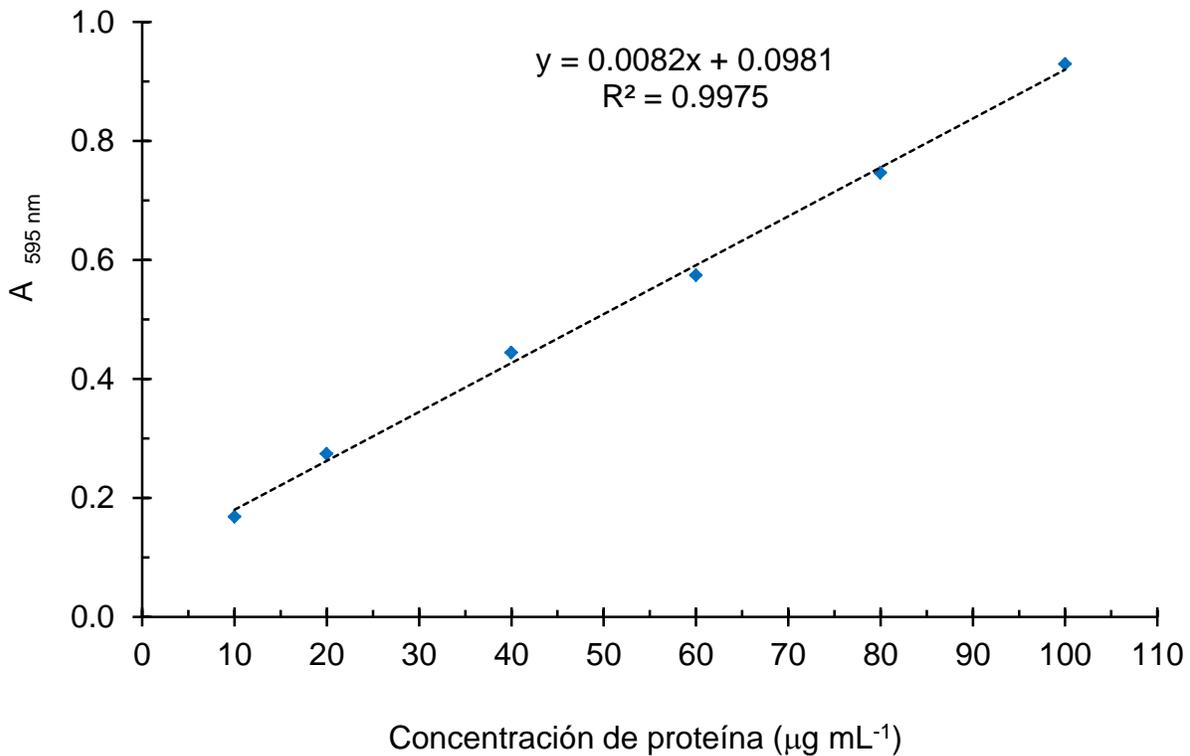


Figura 17. Curva tipo de proteína (albúmina de suero bovino).

## 5.7 Producción de lacasa por el hongo seleccionado

### 5.7.1 Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida

La fermentación sumergida (FESUM) involucra el crecimiento de microorganismos en un medio líquido rico en nutrientes y con una alta concentración de oxígeno (condiciones aeróbicas). La producción industrial de la mayoría de las enzimas se realiza por FESUM, sobre todo cuando se requieren tiempos cortos de proceso (Papinutti y Forchiassin, 2007; Rodríguez y Toca, 2007).

En este trabajo, la FESUM se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL de MME, cuya composición se mencionó en el apartado 5.4. Al MME, se adicionó 1 g de fibra o penca seca y estéril de agave, glucosa (2.5 g L<sup>-1</sup>) y 10 discos con micelio (Figura 18) tomados de las cajas con micelio desarrollado sobre agar extracto de salvado de trigo. Los matraces se

incubaron en oscuridad en un agitador rotatorio, a una velocidad de 120 rpm, a 29 °C por 168 h, midiendo la actividad lacasa y concentración de proteína cada 24 h. Un control procesado bajo las mismas condiciones, se llevó a cabo, teniendo únicamente el hongo como biomasa libre en el MME; no se colocó sustrato (penca o fibra). Los experimentos se realizaron por triplicado.

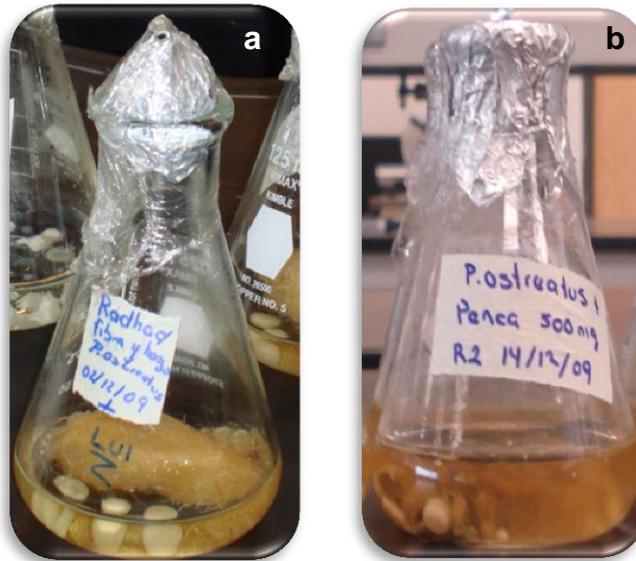


Figura 18. Producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida utilizando fibra (a) y penca (b) de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

### 5.7.2 Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES), se define como el proceso de fermentación que ocurre en ausencia o casi ausencia, de líquido libre, empleando un sustrato inerte (materiales sintéticos) o un sustrato natural (materiales orgánicos) como soporte sólido (Pandey *et al.*, 1999). En años recientes, la FES ha recibido mayor interés por los investigadores, debido a que diversos estudios han mostrado rendimientos superiores que los obtenidos con FESUM (Rodríguez y Toca, 2007).

La producción de lacasa por este tipo de fermentación, se realizó en viales de hemocultivo con tapas de goma, depositando 1 g de penca o fibra seca y estéril, 3 mL de agua destilada estéril y 0.1 g de biomasa fúngica húmeda (equivalente a 0.0077 g de biomasa fúngica seca), como se ilustra en la Figura 19. Los viales se incubaron a

29 °C en la oscuridad durante 480 h, con aireación cada tercer día. Las enzimas se extrajeron cada 120 h, adicionando 50 mL de agua destilada estéril al cultivo sólido y mezclando a 4 °C por 1 h. La mezcla se filtró a través de tela de algodón y el filtrado recuperado se usó como solución enzimática (Chawachart *et al.*, 2004). La actividad lacasa y contenido de proteína se determinaron para cada vial. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El tipo de fermentación que favoreció la mayor actividad enzimática, se utilizó para los experimentos siguientes.

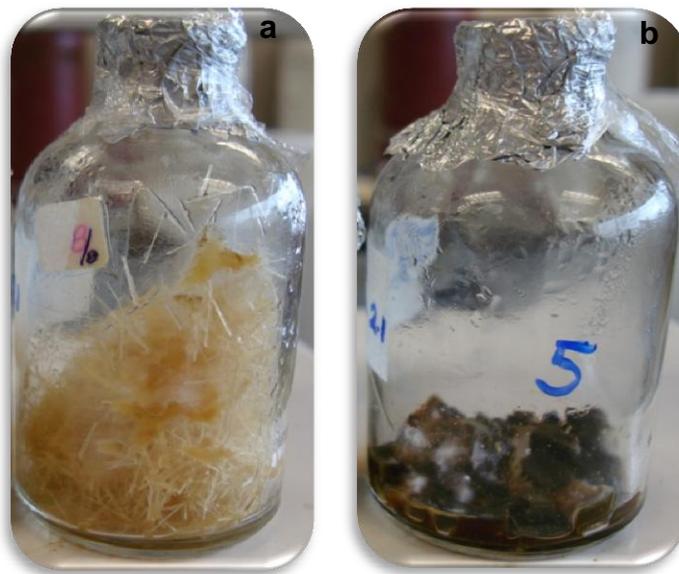


Figura 19. Producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación en estado sólido utilizando fibra (a) y penca (b) de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

### 5.7.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida

El efecto de la concentración de agave sobre la producción de lacasa se determinó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, agregando 50 mL de MME y glucosa ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ) a 0.2, 0.6, 1.0, 2.0 y 3.0 % (p/v) de penca o fibra seca y estéril. Todos los matraces se inocularon con 10 discos con micelio y se incubaron a 29 °C y 120 rpm durante 120 h (Figura 20). La actividad y concentración de proteína se determinaron al final del periodo de incubación. El control utilizado en este ensayo, consistió de hongo como biomasa libre, pero sin agave (sustrato), y se sometió a las mismas condiciones de

crecimiento que los matraces que sí tuvieron tanto hongo como sustrato (penca o fibra). Los experimentos se realizaron por triplicado y la concentración que indujo la más alta actividad enzimática se utilizó para el siguiente experimento.



Figura 20. Producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida con diferentes concentraciones de fibra (a) y penca (b) de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

#### 5.7.4 Efecto de la composición del medio sobre la producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida

Un estudio sobre el efecto de la fibra y penca de agave como sustrato y la composición del medio de cultivo (agua destilada estéril o MME), se llevó a cabo de acuerdo al diseño experimental que se presenta en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Diseño experimental para la determinación del efecto de la composición del medio, sobre la producción de lacasas por *P. ostreatus*, utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

Tratamiento	Sustrato	Medio de cultivo
1	Fibra	Con glucosa en el MME
2	Fibra	Sin glucosa en el MME
3	Fibra	Agua destilada estéril
4	Penca	Con glucosa en el MME
5	Penca	Sin glucosa en el MME
6	Penca	Agua destilada estéril
Controles		
7	Hongo con glucosa en el MME y sin agave	
8	Hongo sin glucosa en el MME y sin agave	
9	Biomasa muerta con glucosa en el MME y sin agave	
10	Penca sin glucosa en el MME y sin biomasa	
11	Fibra sin glucosa en el MME y sin biomasa	

El volumen de trabajo fue de 50 mL de medio de cultivo inoculados con 10 discos con micelio de *P. ostreatus*. La concentración de glucosa fue de 2.5 g L<sup>-1</sup> para el tratamiento 1 y 4, y la concentración de fibra y penca usada en todos los casos, fue 1.0 % (p/v). En los tratamientos 3 y 6, se usó el agua destilada estéril como medio de cultivo en lugar de MME. Los controles para esta prueba fueron: hongo como biomasa libre con glucosa en el MME, pero sin agave (tratamiento 7); hongo como biomasa libre sin glucosa en el MME, sin agave (tratamiento 8); biomasa muerta con glucosa en el MME y sin agave (tratamiento 9); penca sin glucosa en el MME y sin inóculo (tratamiento 10) y fibra sin glucosa en el MME y sin inóculo (tratamiento 11). Todos los tratamientos se incubaron a 29 °C y 120 rpm por 120 h. La actividad enzimática y contenido de proteína se determinaron como se describió en los apartados 5.5 y 5.6, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados de este experimento, se consideraron para el escalamiento en la producción de lacasas.

### **5.7.5 Escalamiento a nivel matraz**

La producción de las enzimas se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL, utilizando únicamente un volumen total de 200 mL con las siguientes condiciones, de acuerdo a los resultados obtenidos de las cinéticas anteriores: 20 discos con micelio por cada 100 mL de medio, penca de agave como sustrato en una concentración del 1 % (p/v), sin la adición de glucosa al medio y utilizando únicamente agua destilada estéril como medio de cultivo. El tipo de fermentación utilizada fue FESUM durante un periodo de producción de 5 días (120 h), con agitación constante a 130 rpm y 29 °C.

### **5.7.6 Escalamiento en biorreactor**

Para este segundo tipo de escalamiento, se utilizaron dos biorreactores de lecho fluidizado con una capacidad de 1.0 y 1.5 L; sin embargo, el volumen efectivo en cada uno de los reactores fueron 400 y 800 mL, debido a la formación de espuma durante la fermentación.

Las condiciones de trabajo en esta prueba fueron: 20 discos con micelio por cada 100 mL de agua destilada estéril como medio de cultivo, 1 % (p/v) de penca como sustrato, temperatura de los depósitos de agua para la saturación del aire de 29 °C, con una presión de saturación de 4 kg cm<sup>-2</sup> y un flujo de aire de 1 mL min<sup>-1</sup>. El tiempo de fermentación fueron 120 h.

La prueba consistió en realizar ciclos de producción enzimática cada 120 h. Al tiempo cero, se inocularon todos los componentes antes señalados y se dejaron fermentar por 120 h. Al término de este tiempo, se drenó únicamente el extracto enzimático y se adicionaron nuevamente 400 y 800 mL de agua destilada estéril a cada reactor, a fin de continuar con más ciclos de fermentación agregando entre cada ciclo, solamente agua destilada estéril, hasta que la producción de lacasas fuera nula.

Al extracto obtenido de cada ciclo fermentativo, se le determinó la actividad enzimática y el contenido de proteína extracelular, por triplicado, de acuerdo a lo establecido en los puntos 5.5 y 5.6.

En la Figura 21, se ilustra una fotografía del sistema de fermentación en biorreactor de lecho fluidizado utilizado en la presente investigación, para la producción de lacasas de *P. ostreatus*

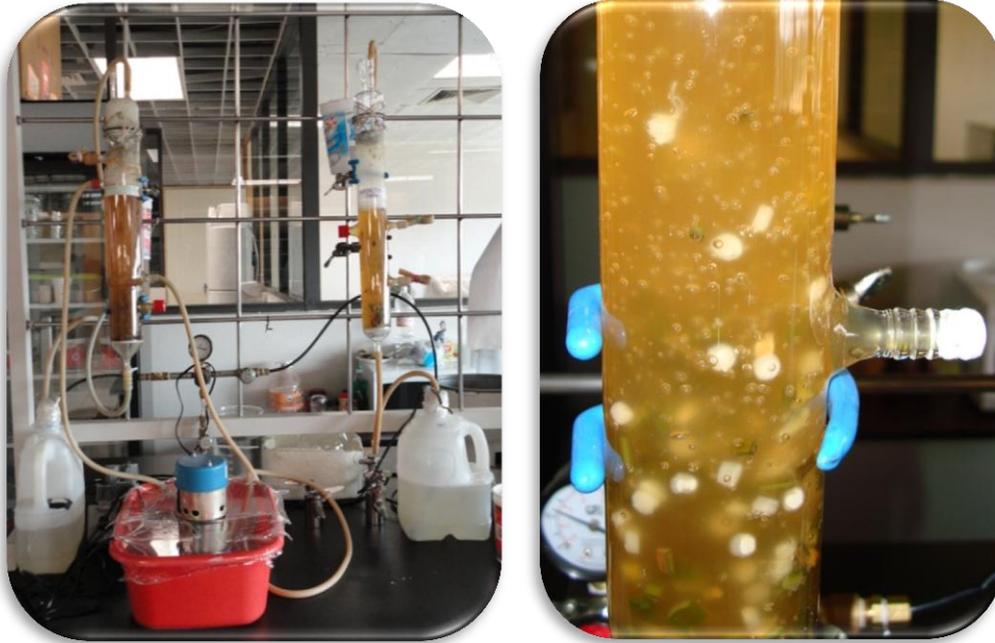


Figura 21. Producción de lacasa de *P. ostreatus* en fermentación sumergida en un biorreactor de lecho fluidizado utilizando penca de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

## 5.8 Purificación parcial de la lacasa

### 5.8.1 Precipitación con sulfato de amonio

El primer paso para la purificación de la lacasa secretada por *P. ostreatus* utilizando penca de agave como sustrato, se llevó a cabo utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Tecsiquim). Para esta etapa, el extracto crudo primeramente se filtró para retirar los residuos de agave que sirvieron como sustrato así como el agar remanente de los discos con micelio. Luego, el extracto enzimático ya filtrado, se precipitó con sulfato de amonio al 90 % de saturación (Anexo 1). Es importante mencionar que la adición de la sal se hizo lentamente y con agitación suave, pues de lo contrario, se puede formar espuma y con ello causar la desnaturalización de la enzima.

Una vez agregado el sulfato de amonio, el extracto saturado se mantuvo en reposo durante 24 h en refrigeración, a una temperatura de 4 °C. Culminado este tiempo, se

centrifugó a 9 000 rpm (equivalentes a 15 077 g) y 4 °C durante 30 minutos en una ultracentrífuga (Beckman Coulter modelo Avanti J-25) para obtener el precipitado de interés, el cual se resuspendió en agua destilada (en una relación de 1 g de precipitado en 10 mL de agua destilada) y se dializó contra agua destilada hasta la desaparición de sales con Ba(OH)<sub>2</sub> 5.0 N, haciendo recambios del líquido cada 8-10 h (Figura 22). Al extracto dializado (ED), se le determinó actividad lacasa y concentración de proteína como se señaló previamente.



Figura 22. Fotografía de la diálisis del extracto enzimático

Finalmente, el ED se liofilizó a - 45 °C (LABCONCO, Freeze Dry System/ Lyph Lock 4.5) durante 3 días, que fue el tiempo en que la fase acuosa se secó completamente (Figura 23). El liofilizado obtenido se conservó en congelación (-20 °C) hasta su uso para la cromatografía de filtración en gel.



Figura 23. Liofilización del extracto dializado de lacasa.

### 5.8.2 Cromatografía de exclusión molecular

Para este segundo paso de purificación, también denominado cromatografía de filtración en gel, se utilizó una columna de vidrio de 47 cm de altura y 2.8 cm de diámetro interno que se empacó con un volumen de cama de 200 mL con Sephadex G-75 (SIGMA Chemical Co., G-75-120), el cual tiene un intervalo de separación de moléculas entre 3 000 y 90 000 Da, pre-equilibrado con regulador fosfato 0.05 M pH 7.0.

Para la formación de una cama compacta de la resina, se hicieron pasar dos volúmenes de columna con el regulador fosfatos 0.05 M pH 7.0. Posteriormente se inyectó la muestra objeto de estudio (Figura 24a), que en este caso fueron 57.6 mg de proteína liofilizada (en base a la determinación por Bradford) que se solubilizó en una mezcla de 5 mL de urea 6 M más 5 mL de regulador fosfatos 0.05 M, pH 7.0, momentos antes de inyectarla. La muestra inyectada en la columna se eluyó con el mismo regulador fosfatos, colectando fracciones cada 200 gotas (Figura 24b), a las cuales se les tomó la absorbencia a 280 nm ( $A_{280}$ ) en un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin Elmer modelo Lambda 25), actividad enzimática y concentración de proteínas como se mencionó en los apartados anteriores.

Las fracciones con una  $A_{280}$  superior a 2.0, se diluyeron 10 veces con regulador fosfatos para obtener lecturas que se encontrarán dentro del intervalo de confianza del propio espectrofotómetro. La fracción que mostró la mayor actividad enzimática, se utilizó para la los ensayos de caracterización enzimática.

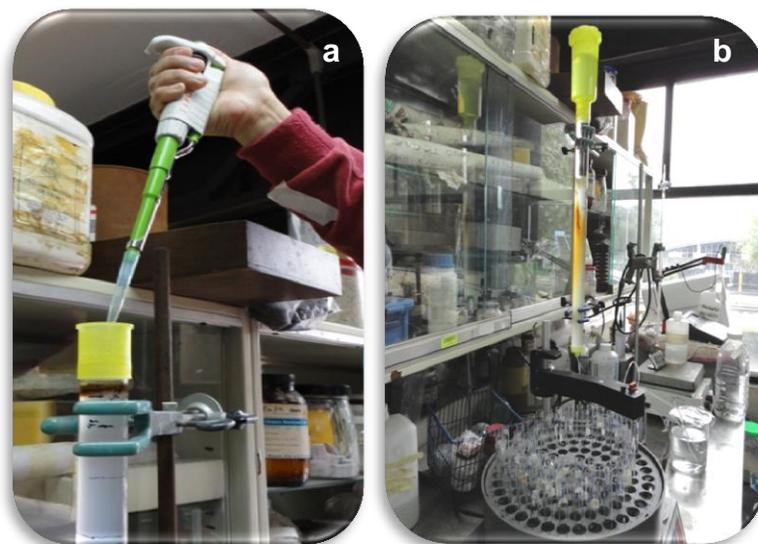


Figura 24. Fotografía de la introducción de la muestra en la columna empacada con Sephadex G-75 (a) y columna y colector utilizados para el fraccionamiento de extracto enzimático en base al tamaño molecular (b).

## 5.9 Caracterización de la lacasa

### 5.9.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis se realizó en minigeles de poliacrilamida de 7.0 cm x 8.0 cm x 0.75, en condiciones nativas, en cámaras Mini-Protean (Bio-Rad). La concentración de poliacrilamida fue del 5 % en el gel concentrador (Cuadro 5) y del 10 % en el gel separador (Cuadro 6). Se cargó un volumen de 15  $\mu$ L de la fracción de interés, previamente concentrada en un ultrafiltro AMICON<sup>®</sup> de 50 mL (Figura 25), y se aplicó un voltaje constante de 100 V, hasta que el frente formado por la migración del azul de bromofenol alcanzó el otro extremo del gel (aproximadamente 60 min).



Figura 25. Fotografía del Filtro AMICON<sup>®</sup>, utilizado para concentrar la fracción enzimática de interés.

Para la identificación de las bandas que aparecieron en el gel, se utilizó un marcador preteñido para geles nativos (Invitrogen-SeeBlue®) que comprende un intervalo de peso molecular de 22 kDa a 669 kDa. El teñido del gel para la aparición de las bandas se hizo inmediatamente después de la electroforesis, utilizando el kit y protocolo para tinción con plata de Bio-Rad.

Cuadro 5. Cantidades necesarias para la preparación del gel concentrador de poliacrilamida al 5 %.

Reactivo	5 %	
Agua Milli-Q	2.10	mL
Tris 1.0 M (pH 6.8)	0.38	mL
Acrilamida/bis (30 %)	0.50	mL
Persulfato de amonio (10 %)	0.03	mL
TEMED	0.003	mL
Volumen total	3.0	mL

Cuadro 6. Cantidades necesarias para la preparación del gel de separación de poliacrilamida al 10 %

Reactivo	10 %	
Agua Milli-Q	5.90	mL
Tris 1.5 M (pH 8.8)	3.80	mL
Acrilamida/bis (30 %)	5.00	mL
Persulfato de amonio (10 %)	0.15	mL
TEMED	0.006	mL
Volumen total	15.0	mL

Una vez que se obtuvieron los geles y las bandas de éstos se revelaron, se construyó una curva tipo con el peso molecular de los estándares utilizados, a fin de determinar, de manera más precisa, el peso molecular de las bandas que aparecieron en cada carril.

Para la curva tipo, se graficó el logaritmo del peso molecular de cada uno de los marcadores contra la movilidad relativa de los mismos ( $R_f$ ), la cual se encuentra dividiendo la distancia de migración desde el tope superior del gel al centro de la

banda de la proteína de interés, entre la distancia recorrida del azul de bromofenol (Desentis, 2006).

$$R_f = \frac{\text{Distancia de la migración proteica}}{\text{Distancia de la migración del colorante}} \quad \text{Ecuación (8)}$$

Usando la curva tipo, se calculó el peso molecular de las proteínas de interés.

Otra herramienta utilizada para visualizar el número de bandas presentes en el gel electroforético, fue con el programa GelAnalyzer 2010 (gelanalyzer.com), en el cual se realizó el barrido de un área determinada (seleccionada por el analista), y se obtuvo un perfil de intensidad de cada banda presente. En este programa, la distancia a la cual se ubica cada banda proteica, está dada en pixeles y no en cm. No obstante, es una forma útil para estimar, gráficamente, la concentración de las proteínas de interés.

### **5.9.2 Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción**

Para los estudios cinéticos de la lacasa producida, se prepararon soluciones de la misma, a 5 cantidades diferentes: 25, 50, 75, 100 y 150 mg L<sup>-1</sup>, a las cuales se les midió la absorbencia al tiempo cero y 3 minutos después de reaccionar con ABTS 5 mM, para así obtener el cambio en la absorbencia por minuto y expresar la velocidad de reacción en U min<sup>-1</sup>. Una unidad de actividad, está definida como el cambio en la absorbencia en 0.001 min<sup>-1</sup>.

Los volúmenes tomados de cada reactivo para esta llevar a cabo esta prueba se muestran en el Cuadro 7, donde el volumen final de reacción fue de 1 mL:

Cuadro 7. Volúmenes de reactivo para la cinética de concentración de enzima, sobre la velocidad de reacción

Concentración de enzima (mg L <sup>-1</sup> )	Cantidad de Enzima (mL)	Regulador acetato de sodio 100 mM, pH 4.5 (mL)	ABTS 5 mM (mL)
25	0.0153	0.8847	0.1
50	0.0307	0.8693	0.1
75	0.0461	0.8539	0.1
100	0.0614	0.8386	0.1
150	0.0922	0.8078	0.1

Los ensayos se realizaron por triplicado, y para cada concentración se preparó un blanco de ajuste que contenía únicamente la enzima señalada para cada concentración y el regulador, de manera que el volumen final también fue de 1 mL.

### 5.9.3 Efecto de la concentración de ABTS sobre la actividad lacasa

La velocidad de reacción de la lacasa se midió con 0.1 mL de ABTS, a una concentración de 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 mM, y con una concentración de enzima de 150 mg L<sup>-1</sup> (0.0922 mL) en todos los casos, ya que con esta concentración, se obtuvo la mayor actividad lacasa, expresada de igual manera, en U min<sup>-1</sup>. El resto del volumen se completó con regulador acetato de sodio 100 mM, pH 4.5. Cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado, preparando un blanco de ajuste que contenía la enzima y el regulador.

### 5.9.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La influencia de la temperatura sobre la actividad lacasa se estudió en un intervalo de temperatura de 20 a 60 °C, preparando una serie de tubos que contenían 150 mg de enzima (0.0922 mL) y 0.8078 mL de regulador acetato de sodio 100 mM, pH 4.5; el tiempo de incubación a cada temperatura fue de 5 minutos en un baño María, y posteriormente, los tubos se enfriaron y se agregó 0.1 mL de ABTS 9 mM como

sustrato. Las pruebas a cada temperatura fueron por triplicado, con su respectivo blanco de ajuste.

#### **5.9.5 Termoestabilidad de la lacasa**

Para determinar la estabilidad a la temperatura, se prepararon series de tubos que contenían la lacasa parcialmente purificada (0.0922 mL) y el regulador acetato de sodio 100 mM, pH 4.5 (0.8078 mL). Los tubos se incubaron a temperaturas desde 30°C hasta 60 °C durante 15 min e inmediatamente después, se enfriaron para determinar la actividad enzimática, agregando 0.1 mL de ABTS 9 mM a cada tratamiento. Para esta prueba, la actividad determinada previa a la incubación (20 °C), se consideró como el 100 %, de modo que la velocidad de reacción se expresó como actividad residual (%). Las pruebas a cada temperatura fueron por triplicado, con su respectivo blanco de ajuste.

#### **5.9.6 Efecto del pH sobre la actividad lacasa**

La determinación del pH óptimo para mantener la actividad de la lacasa parcialmente purificada, se evaluó a 40 °C con diferentes valores de pH, desde 3.0 hasta 7.0 (Anexo 2), utilizando soluciones reguladoras de ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M (Dawson *et al.*, 1969), ajustadas a una fuerza iónica de 0.150 con NaCl (Fermont). Las condiciones de reacción fueron 0.0922 mL de la enzima parcialmente pura, 0.8078 mL de regulador ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M y 0.1 mL de ABTS 9 mM. La temperatura de incubación fue a la temperatura óptima para la enzima, durante un tiempo de incubación de 5 min. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

#### **5.9.7 Análisis estadístico**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y como análisis estadístico se realizó un ANOVA y una comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos, utilizando el paquete estadístico SAS, versión 8.0.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Selección de la cepa productora de lacasas

De las 5 cepas fúngicas propuestas para su análisis de actividad lacasa, se seleccionó al hongo basidiomiceto *P. ostreatus*, ya que mostró la mayor actividad lacasa. El hongo *Trametes versicolor* presentó una actividad enzimática de 27.74 U L<sup>-1</sup> a las 168 h de FESUM, utilizando fibra como sustrato, mientras que *P. ostreatus* tuvo una actividad 10 veces mayor (251.42 U L<sup>-1</sup>) con el mismo sustrato y en el mismo lapso de tiempo de FESUM. Los tres hongos no identificados que fueron aislados del reactor utilizado para la oxidación de manganeso, no presentaron actividad lacasa, pese a que la literatura reporta que en la oxidación de metales como manganeso, se pueden producir pequeñas cantidad de esta enzima. Por lo tanto, la cepa fúngica con la que se realizaron el resto de los ensayos fue con *P. ostreatus*.

### 6.2 Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida

La producción de lacasa en FESUM, mostró que el tiempo requerido para lograr la máxima actividad enzimática fueron 120 h, usando tanto penca como fibra como sustrato, obteniendo una actividad máxima de 217.91 y 306.21 U L<sup>-1</sup>, respectivamente. Después de 120 h de cultivo, la actividad enzimática disminuyó considerablemente ( $p \leq 0.05$ ), de tal modo que a las 168 h, la actividad lacasa fue de 148.89 y 190.41 U L<sup>-1</sup> con penca y fibra, respectivamente (Figura 26). En contraste, el tratamiento con hongo como biomasa libre, que únicamente tuvo como fuente de carbono a la glucosa del medio de cultivo, presentó una actividad lacasa 17.38 veces menor que el tratamiento donde se utilizó la fibra, y 12.37 veces menor en comparación con la actividad alcanzada usando penca como sustrato, a las mismas 120 h de fermentación.

Estos valores denotan que el agave, ya sea la fibra o penca, es un sustrato adecuado para inducir una alta actividad lacasa en un tiempo relativamente corto.

También se puede observar que sólo hasta las 48 h de FESUM, la tendencia de la actividad lacasa utilizando penca y fibra, es semejante, y después de este periodo, la

fibra induce una mayor actividad enzimática, debido posiblemente, a un aumento en la biomasa producida.

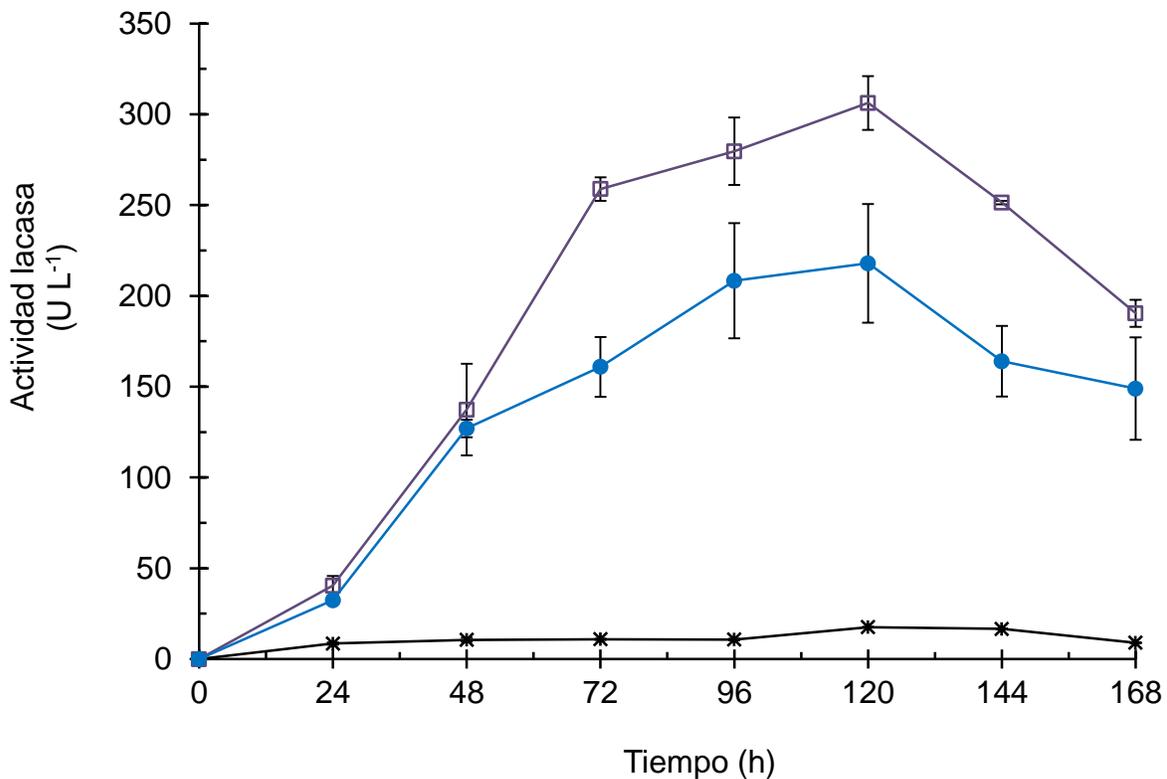


Figura 26. Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm. —\*—Hongo libre, —□—Fibra, —●—Penca

Comercialmente, el sustrato natural más utilizado en el cultivo de *P. ostreatus* es la paja de trigo (Souza *et al.*, 2002). Sin embargo, dado el amplio campo de aplicación de las lacasas, se han propuesto el aprovechamiento de otros residuos naturales como la pulpa de café, paja de algodón, paja de cebada, bagazo de la caña de azúcar, rastrojos de maíz o cascarilla de arroz (Chawachart *et al.*, 2004). Sin embargo, no todos los residuos agrícolas son eficientes sustratos para la producción de lacasas, ya que factores de la fermentación como la composición del medio, composición del sustrato, fuente de carbono, pH, temperatura, tamaño de partícula y aireación, afectan la producción enzimática (Chawachart *et al.*, 2004).

Membrillo *et al.*, (2008), destacan que la producción de enzimas ligninolíticas por *P. ostreatus*, depende fuertemente de la cepa, composición del sustrato y condiciones del medio de cultivo. Así, al comparar los resultados obtenidos con los reportados por Tlecuitl *et al.*, (2008), se obtienen diferencias importantes, ya que dichos investigadores encontraron para este mismo hongo, una actividad máxima de 12 000 U L<sup>-1</sup> a un tiempo de 400 h de FESUM. Estas diferencias en la actividad lacasa se pueden atribuir a la composición del medio utilizado, ya que los autores manifiestan el uso de un medio líquido mineral enriquecido con glucosa (10.5 g L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (5 g L<sup>-1</sup>), microelementos y cobre; este último elemento se ha reportado que regula la producción de formas moleculares múltiples de lacasa y además, favorece el incremento en la producción de lacasas, debido a que esta enzima contiene átomos de este metal en su estructura (Palmieri *et al.*, 2003).

Guillén *et al.*, (1998), también evaluaron la producción de enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus* en FESUM en un reactor, usando un medio sintético con extracto de levadura y glucosa (0.5 g L<sup>-1</sup>), y los valores que encontraron para actividad lacasa son similares a los obtenidos en este trabajo utilizando la fibra de agave, pues reportan una actividad de 307 U L<sup>-1</sup> a las 85 h de fermentación, en tanto que en esta investigación, se obtuvieron 306.21 U L<sup>-1</sup> a las 120 h de incubación con fibra como sustrato y a una menor escala. Por su parte, Ramírez *et al.*, (2003) encontraron una actividad lacasa de 8 000 U L<sup>-1</sup> a las 480 h, también en FESUM, pero manifiestan el uso de cobre como inductor en el medio de cultivo, ya que sin este elemento, han observado el cultivo con suficiente biomasa, pero sin actividad lacasa.

Stajic *et al.*, (2006), encontraron para *P. ostreatus* cepa No. 494, una máxima actividad lacasa en FESUM de 256 U L<sup>-1</sup> a las 120 h de incubación, utilizando únicamente como sustrato cáscara seca de mandarina. Este valor es semejante al alcanzado en esta investigación usando la misma especie de hongo, pero diferente residuo. Con esto se puede resaltar que tanto el uso de inductores como el cobre y la fuente de carbono, influyen fuertemente sobre la actividad de la lacasa, y aunque se

trate del mismo género y especie de hongo, el tipo de cepa también repercute sobre la cantidad de enzimas producidas en el metabolismo secundario del hongo.

Otro estudio realizado con el hongo de la podredumbre blanca *Coriolus versicolor* en FESUM durante 360 h, empleando cascarilla de arroz, paja de trigo y glucosa como fuente de carbono, reveló una actividad máxima de lacasa de 222, 90, y 10 U L<sup>-1</sup>, respectivamente (Chawachart *et al.*, 2004). Estos resultados son inferiores a la actividad máxima encontrada en este trabajo a las 120 h usando fibra o penca, lo que indica que la expresión de las lacasas por el hongo está influenciada por las condiciones de cultivo, así como la naturaleza de la fuente de carbono (Krishna *et al.*, 2005).

El tamaño de partícula es un factor importante que influye sobre la producción de enzimas ligninolíticas. La acción enzimática sobre el sustrato depende de las propiedades del material, incluyendo la naturaleza cristalina o amorfa, el área accesible, área superficial, porosidad y principalmente el tamaño de partícula (Membrillo *et al.*, 2008). Esto puede explicar la menor actividad lacasa usando penca como sustrato (217.91 U L<sup>-1</sup>) en lugar de fibra (307.21 U L<sup>-1</sup>), ya que el tamaño de partícula en el primer caso, es mayor y su geometría es más compleja.

Así, las partículas de fibra, las cuales fueron lavadas durante su proceso de obtención, tuvieron la molécula de lignina más expuesta, por lo que la inducción de lacasa se favoreció (Membrillo *et al.*, 2008).

Respecto al contenido de proteína extracelular, la variación fue de 21.49 mg L<sup>-1</sup> a las 24 h, a 25.50 mg L<sup>-1</sup> a las 168 h con penca, mostrando un comportamiento constante, en tanto que la proteína producida con fibra, osciló entre 11.40 mg L<sup>-1</sup> a las 24 h, hasta 35.75 mg L<sup>-1</sup> a las 168 h, lo que señala que la mayor actividad enzimática obtenida con fibra, se debe a una mayor cantidad de enzimas producidas mientras que con el uso de penca, se inducen enzimas más activas (Figura 27).

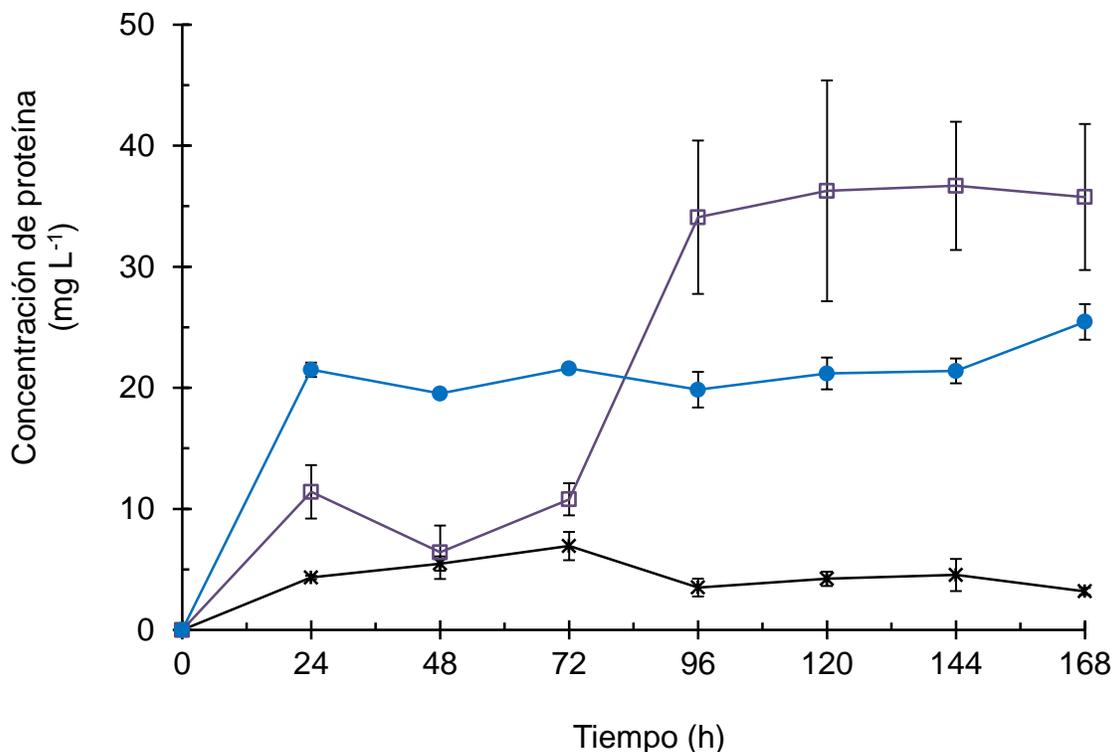


Figura 27. Concentración de proteína extracelular de *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm.  
 \*— Hongo libre, —□— Fibra, —●— Penca

Para determinar qué tan activa es una enzima, se obtiene la actividad específica, que es la relación entre la actividad lacasa ( $\text{U L}^{-1}$ ) y el contenido de proteína ( $\text{mg L}^{-1}$ ). En este sentido, se encontró que la actividad específica más alta se obtuvo en FESUM con fibra, con un valor máximo de  $24.15 \text{ U mg}^{-1}$  a las 72 h, disminuyendo a un valor de  $8.29 \text{ U mg}^{-1}$  a las 96 h. Lo anterior significa que la alta actividad enzimática lograda a las 120 h usando la fibra como sustrato, se debe a una mayor cantidad de proteínas producidas, por lo cual la actividad específica a las 120 h fue menor ( $8.77 \text{ U mg}^{-1}$ ).

En el caso de la penca, la actividad específica a lo largo de los días de fermentación fue constante, a diferencia de la fibra, pues entre las 48 y 168 h, no hubo diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). La actividad específica a las 120 h, usando penca como sustrato, fue de  $10.25 \text{ U mg}^{-1}$  como se presenta en la Figura 28. Al comparar tanto los resultados de la actividad específica obtenida con fibra como con penca a las 120 h de fermentación, se puede observar que el primer sustrato induce enzimas

menos activas que usando penca. Este hecho es importante desde el punto de vista industrial, pues indica que la penca favorece la producción de menos cantidad de lacasas, pero más activas, aspecto que resulta deseable en este tipo de investigaciones. Sin embargo, estos resultados difieren con lo reportado por Alonso *et al.*, (2007), quienes observaron una actividad específica de las lacasas de *P. ostreatus* en fermentación sumergida de 242.3 U mg<sup>-1</sup> a las 480 h de FESUM, valor 27.6 veces mayor al obtenido con fibra a las 120 h, y 23.63 veces mayor que el logrado con penca, al mismo tiempo de fermentación. Con estos resultados nuevamente se puede notar que la expresión de lacasas, depende de la constitución del medio que se utilice.

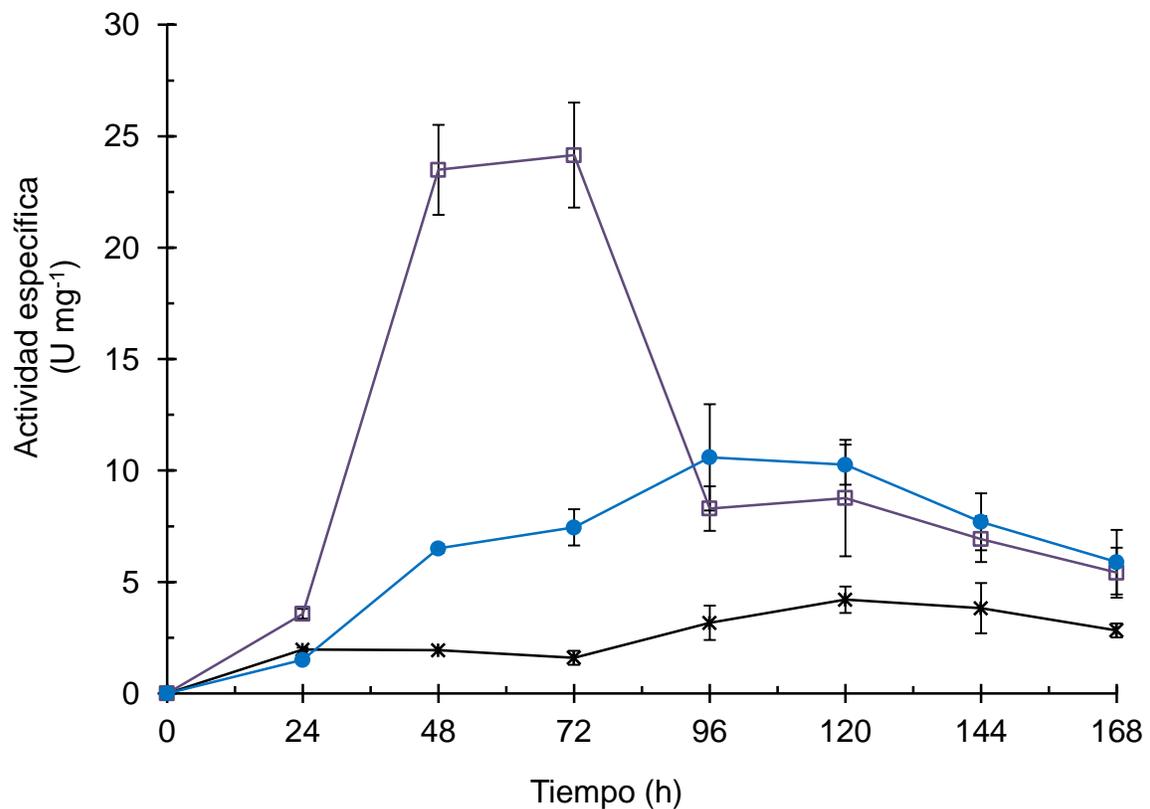


Figura 28. Actividad específica de las lacasas de *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm. —\*—Hongo libre, —□—Fibra, —●—Penca

En el tratamiento del hongo libre, la actividad específica fue de 4.20 U mg<sup>-1</sup> a las 120 h, valor 2.08 veces menor que la actividad específica obtenida con fibra y 2.44 veces menor que la actividad específica alcanzada con la penca, de manera que el uso de agave como sustrato favorece la producción de enzimas activas.

### **6.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida**

Para esta cinética se emplearon 5 concentraciones de fibra y penca como sustrato (0.2, 0.6, 1.0, 2.0 y 3.0 % p/v) y un tiempo de FESUM de 120 h, de acuerdo a los resultados de la cinética anterior, ya que fue el tiempo necesario para alcanzar la máxima actividad enzimática.

Las actividades de lacasa que se obtuvieron con 0.0, 0.2, 0.6, 1.0, 2.0 y 3.0 % (p/v) de fibra, fueron de 17.61, 25.41, 105.28, 169.25, 279.96 y 541.71 U L<sup>-1</sup>, respectivamente, en tanto que con el uso de la penca, las actividades de lacasa fueron de 17.61, 156.05, 202.88, 276.36, 187.00 y 256.92 U L<sup>-1</sup> a las mismas concentraciones de sustrato (Figura 29).

Krishna *et al.*, (2005) y Guo-Qing y col. (2009), refieren que uno de los factores que conducen a un aumento en la actividad de enzimas ligninolíticas, es el incremento en la concentración de material lignocelulósico empleado como sustrato, pero cualquier factor individual puede interactuar con cualquiera o todos los demás factores del medio del cultivo, creando así un gran número de interacciones. Por ello, es esencial optimizar todas las condiciones de cultivo y composición del medio de producción, lo cual facilita el diseño de sistemas de fermentación económicos a gran escala y la expresión efectiva de lacasas. Ahora bien, el considerar el uso de altas concentraciones de material lignocelulósico para incrementar la actividad enzimática, implica una reducción de otras fuentes de carbono adicionales, como la glucosa, manosa, maltosa, fructosa o lactosa (fuentes de carbono comúnmente utilizadas), para así lograr un aprovechamiento eficiente del material lignocelulósico (Krishna *et al.*, 2005).

En este trabajo, la glucosa no se suprimió del medio de cultivo y los resultados encontrados confirman, para el caso de la cinética realizada con fibra, que a mayor concentración de sustrato en el medio, mayor fue la actividad lacasa, encontrándose diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las diferentes concentraciones

utilizadas; por el contrario, con el uso de la penca, la máxima actividad enzimática se alcanzó con 1 % (p/v) de penca, pues las concentraciones de 2.0 y 3.0 % (p/v), probablemente causaron un exceso en el nivel de carbono en el medio, ya que la penca, además de poseer lignina en su estructura, contiene 4.4 % (p/p) de azúcares reductores, lo que provoca que el exceso de carbono disminuya la producción de lacasas, al obstruir la iniciación de crecimiento del hongo (Mester *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004). De aquí la importancia de optimizar las condiciones de cultivo.

Lee *et al.*, (2004), establecen también que una relación en la que los organismos productores de lacasa crecen satisfactoriamente, es en un medio que contenga 0.1 % (p/v) de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 1 % (p/v) de fuente de carbono.

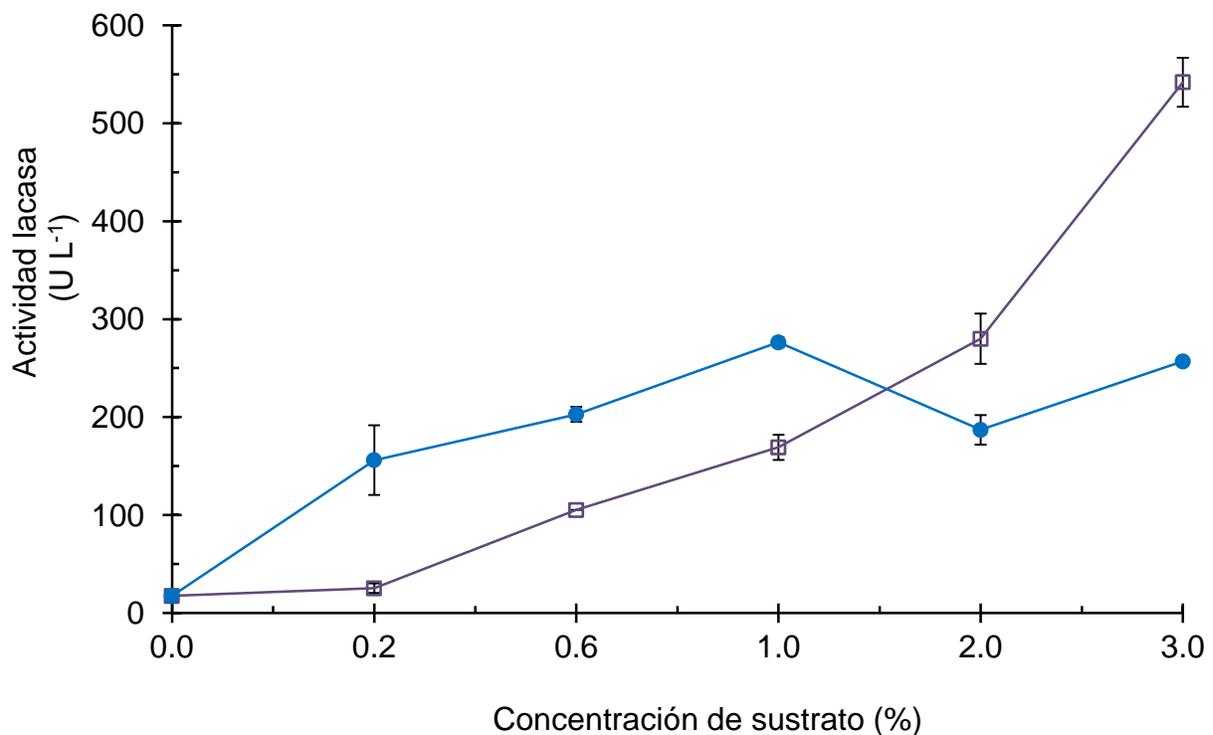


Figura 29. Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* con diferentes concentraciones de residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm; tiempo de incubación: 120 h. —□— Fibra, —●— Penca

Cabe destacar que la fermentación en donde se utilizó fibra a concentraciones de 2.0 y 3.0 % (p/v), presentaron dificultad en su manejo, dado que las características que adquirió el medio fueron semisólidas, asemejándose a una fermentación sólida, razón por la que se realizó la producción de lacasas en fermentación sólida (FES), de manera que la penca resultó un mejor sustrato bajo el sistema de FESUM.

Chawachart y colaboradores (2004), evaluaron el efecto de la concentración al 0.5% (p/v), 1 % (p/v) y 2% (p/v) de cascarilla de arroz en medio líquido, sobre la producción de lacasas por el hongo *Coriolus versicolor*, encontrando que las concentraciones del 1 y 2 % indujeron la mayor actividad enzimática, con 170 y 190 U L<sup>-1</sup>, respectivamente, pero la productividad de la lacasa por gramo de sustrato usando 1 % de cascarilla de arroz fue mayor (17 U g<sup>-1</sup>) que usando 2 % (9.5 U g<sup>-1</sup>).

Considerando este estudio, se encontró que la productividad de la lacasa utilizando una concentración de 1 % (p/v) de penca como sustrato fue de 27.63 U g<sup>-1</sup>, valor 62.52 % mayor que usando 1 % (p/v) de cascarilla de arroz y en el caso de la concentración de 2 % (p/v) de penca, la productividad de la lacasa por gramo de sustrato fue de 9.35 U g<sup>-1</sup>, productividad 1.58 % menor que la hallada con 2 % (p/v) de cascarilla de arroz.

En el cultivo con fibra, no hubo diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) en la productividad enzimática por gramo de residuo entre las concentraciones del 1 y 3 % (p/v), cuya productividad fue de 16.92 y 18.05 U g<sup>-1</sup>, respectivamente, por lo que la mejor concentración para el aprovechamiento eficiente de la fibra por el hongo fue también con 1 % (p/v). Sin embargo, al comparar la productividad de la lacasa obtenida con 1 % (p/v) de fibra y penca, se encontró que con este último sustrato, existe un mejor aprovechamiento del mismo, ya que la productividad es 1.63 veces mayor que usando fibra. No obstante, la concentración óptima de agave, indistintamente de la presentación, fue 1 % (p/v).

En cuanto al contenido de proteínas, éste aumentó con el uso de mayor cantidad de fibra, variando desde 4.22 mg L<sup>-1</sup> sin disponibilidad de agave, hasta 62.69 mg L<sup>-1</sup> con 3.0 % (p/v) de fibra; con el uso de penca, la concentración de proteína extracelular osciló de 4.22 mg L<sup>-1</sup> sin agave, a 24.72 mg L<sup>-1</sup> con 3.0 % (p/v) de penca (Figura 30).

Cabe mencionar que con el uso de 1 % (p/v) de penca, se favoreció la secreción de una mayor cantidad de lacasas (40.33 mg L<sup>-1</sup>) si se compara con el contenido de proteína producido con fibra, a la misma concentración (18.06 mg L<sup>-1</sup>), lo que sugiere que el eficiente aprovechamiento de la penca como sustrato al 1 % (p/v) por el hongo, se debió a una alta cantidad de enzimas secretadas, mientras que la menor productividad obtenida con fibra, se debió al menor contenido proteico.

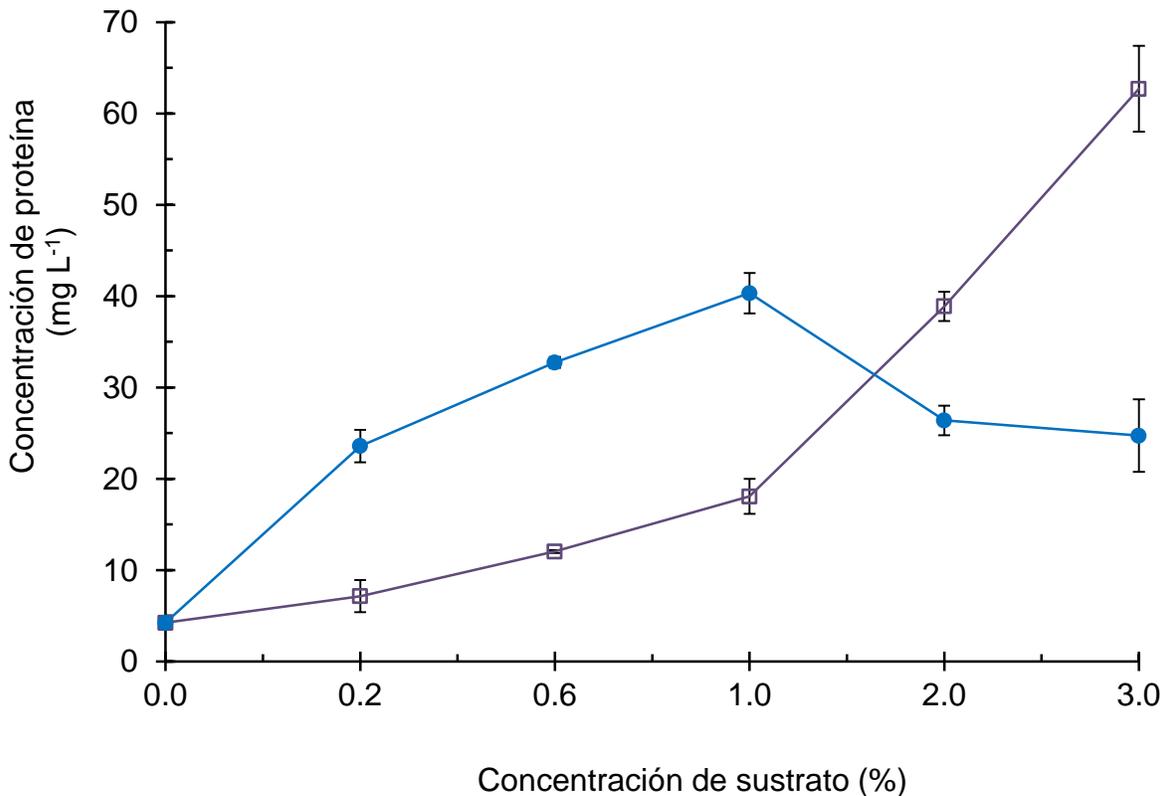


Figura 30. Concentración de proteína extracelular de *P. ostreatus* con diferentes concentraciones de residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm; tiempo de incubación: 120 h. —□— Fibra, —●— Penca

Sin embargo, aunque el aprovechamiento de la fibra por el hongo fue menor, las lacasas producidas fueron más activas que las inducidas con penca, pues la actividad específica con fibra al 1 % (p/v), fue de 9.46 U mg<sup>-1</sup>, mientras que con la penca a esa misma concentración, la actividad específica fue de 6.87 U mg<sup>-1</sup> (Figura 31). Esto quiere decir que con la fibra se produce una cantidad inferior de lacasas pero más activas que usando penca, aunque el hongo no aproveche eficientemente dicho sustrato. Este comportamiento se puede atribuir a que en las fracciones de fibra, la molécula de lignina está más expuesta al hongo, lo que ayuda a inducir enzimas más activas para llevar a cabo su degradación, a diferencia de la penca, que al tener una constitución y geometría más compleja, indujo la producción de lacasas menos activas y que a su vez, probablemente propició la secreción de otras enzimas ligninolíticas distintas a la lacasa, las cuales contribuyeron al aprovechamiento eficiente del sustrato, razón por la cual tanto la concentración de proteína así como la productividad de las lacasa, fueron mayores que al utilizar la fibra (Chawachart *et al.*, 2004).

Los resultados de la actividad específica encontrados en este trabajo, son menores a los reportados por Alonso *et al.*, (2007), quienes observaron una actividad específica de 242.3 U mg<sup>-1</sup> a las 480 h de FESUM, utilizando un medio líquido compuesto con minerales, glucosa (10 g L<sup>-1</sup>) y sulfato de cobre (0.25 g L<sup>-1</sup>), aspecto que resalta que la expresión de lacasas se modifica dependiendo de la composición del medio de cultivo que se utilice.

Por tanto, considerando los resultados encontrados en esta prueba, se utilizó 1.0 % (p/v) de sustrato en el siguiente experimento, debido a que con esta concentración se obtuvieron mejores resultados para ambas presentaciones de agave, además de que en el caso de la fibra, concentraciones mayores al 1.0 %, hacen que el medio de fermentación adquiera las características de un cultivo semisólido.

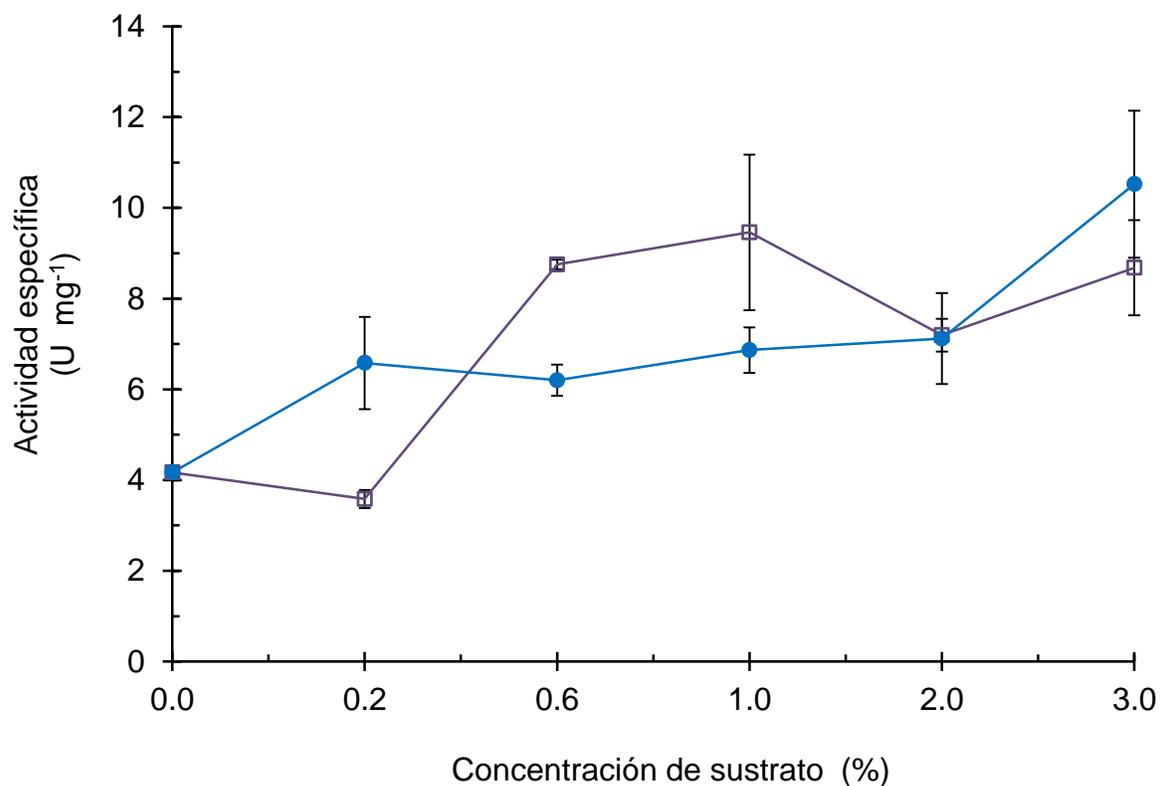


Figura 31. Actividad específica de las lacasas de *P. ostreatus* con diferentes concentraciones de residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm; tiempo de incubación: 120 h. —□— Fibra, —●— Penca

#### 6.4 Efecto de la composición del medio sobre la producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación sumergida

La importancia de la fuente de carbono en el medio de cultivo para la producción de enzimas ligninolíticas, ha sido documentada en estudios previos (Krishna *et al.*, 2005; Guo-Qing *et al.*, 2009; Stajic *et al.*, 2006). Mansur *et al.*, (1997) mostraron que el uso de fructosa en lugar de glucosa en el medio, resultó en un incremento de 100 veces en la actividad específica de Basidiomicetes.

En este sentido, los resultados obtenidos muestran que la actividad lacasa presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) cuando la glucosa se adicionó al MME, utilizando ya sea fibra o penca como sustrato, logrando un aumento en la actividad lacasa de 29.88% (tratamientos 1 y 2) usando fibra como sustrato y 46.16 % con la penca (tratamiento 4 y 5).

Este comportamiento ha sido reportado por otros autores. Así, Martínez *et al.*, (2005) encontraron que la glucosa tuvo un efecto significativo sobre los valores de la actividad lacasa del hongo *Trametes versicolor* en un reactor de lecho fluidizado en FESUM; esto debido a que el hongo toma la glucosa como fuente de carbono fácilmente asimilable para la producción de biomasa. La no adición de glucosa, disminuye la actividad enzimática hasta  $3 \text{ U L}^{-1}$ .

También, Martínez *et al.*, (2005), encontraron una actividad de lacasa de  $8.34 \text{ U L}^{-1}$  al usar  $0.250 \text{ g}$  de glucosa  $\text{L}^{-1}$ , en tanto que en el presente trabajo, la actividad fue de  $152.1 \text{ U L}^{-1}$  usando fibra y  $222.6 \text{ U L}^{-1}$  con penca; en ambos casos, utilizando una concentración de glucosa de  $2.5 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 32).

Lo anterior manifiesta el efecto que tiene no sólo la adición de glucosa al medio de cultivo, sino también la concentración que se use, ya que en este caso se adicionó 10 veces más azúcar.

Al respecto, Guillén *et al.*, (1998), reportan que al incrementar el suministro de glucosa, aumenta la producción de biomasa pero el rendimiento de biomasa/glucosa disminuye. Así, una concentración de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa en cultivo sumergido, produce menos biomasa, pero un mayor rendimiento biomasa/glucosa, que si se suministran  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa, donde se obtiene la mayor producción de biomasa pero con un rendimiento biomasa/glucosa menor. De igual manera indican que *P. ostreatus* utiliza la glucosa eficientemente y la biomasa final depende directamente de la concentración de glucosa que se use. La actividad lacasa que Guillén *et al.*, (1998) reportan usando un medio de cultivo constituido por extracto de levadura y glucosa ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) es de  $307 \text{ U L}^{-1}$  en FESUM durante 85 h; sin embargo, dicha actividad es mayor que la encontrada en la presente contribución, debido a que la concentración de glucosa empleada en este caso, fue la mitad que la utilizada por Guillén y colaboradores.

También se puede observar en la Figura 32, que las condiciones que prevalecieron en el tratamiento 4 (penca y glucosa en el MME), promovieron la más alta actividad enzimática, debido a que los azúcares reductores contenidos en la penca (4.4 % p/p), así como la fuente de carbono suplementada por la glucosa en el MME, ayudaron a la acumulación de biomasa en el medio de cultivo, por lo que la producción de lacasa se afectó positivamente (Souza *et al.*, 2006).

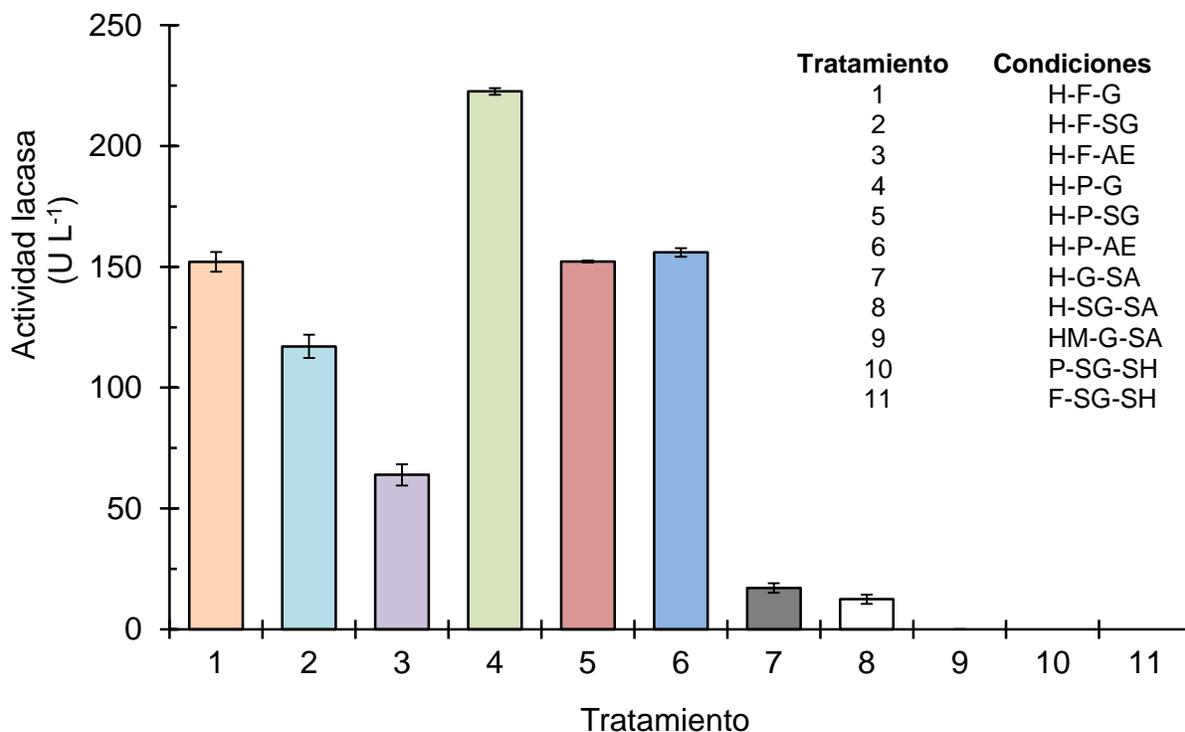


Figura 32. Efecto de la composición del medio sobre la producción de lacasa por *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm; tiempo de incubación: 120 h. H: Hongo; F: Fibra; G: Glucosa en el MME; SG: Sin glucosa en el MME; AE: Agua estéril como medio; P: Penca; SA: Sin agave; HM: Hongo muerto; SH: Sin hongo

Cuando la penca fue la única fuente de carbono y se suspendieron en agua destilada estéril (tratamiento 6), la actividad lacasa no presentó diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto al medio que contenía fibra, glucosa y minerales (tratamiento 1); por el contrario, en comparación con el medio constituido por hongo, fibra y agua destilada estéril (tratamiento 3), se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ). Estos resultados sugieren que tanto los azúcares reductores

como los minerales de la penca, son liberados en las primeras horas de fermentación, y que ambos elementos son usados por el hongo como fuente de carbono fácilmente asimilable para la producción de biomasa y lacasas (Guillén *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002). En el tratamiento 3, al existir únicamente la lignina de la fibra de agave como sustrato y carecer de azúcares y minerales en el medio, el hongo no tiene una producción de lacasa comparable a la alcanzada con el tratamiento 6.

Un estudio realizado por Stajic *et al.*, (2006), mostró que en FESUM, el nivel más alto de actividad lacasa en *P. eryngii* se encontró con cáscara seca de mandarina como fuente de carbono, después de 168 h de cultivo ( $999.5 \text{ U L}^{-1}$ ), mientras que un bajo nivel de actividad lacasa se obtuvo con glucosa como fuente de carbono después de 168 h de FESUM ( $4.4 \text{ U L}^{-1}$ ).

De manera similar, *P. ostreatus* cepa 494, presentó una alta producción de lacasa en FESUM con cáscara de mandarina al quinto día de fermentación ( $256 \text{ U L}^{-1}$ ), mientras que una actividad enzimática de  $45.5 \text{ U L}^{-1}$  se obtuvo con glucosa y de  $46.6 \text{ U L}^{-1}$  usando manitol como fuente de carbono, en ambos casos, después de 168 h de cultivo (Stajic *et al.*, 2006).

De acuerdo con Elisashvili *et al.*, (2002), la máxima actividad lacasa alcanzada por *P. ostreatus*, fue en un medio de cultivo que contenía manitol; por su parte Ardon *et al.*, (1996), encontraron que el cultivo de *P. ostreatus* con extracto de tallo de algodón, ayudó tanto un aumento en la actividad lacasa como una mayor degradación de la lignina.

Respecto a los controles, los tratamientos 7 y 8, sí presentaron actividad enzimática, ya que en el MME había glucosa como fuente de carbono y biomasa libre viva. Los controles en los que no se inocularon discos con micelio fúngico (tratamiento 9 a 11), no se detectó actividad lacasa, lo cual era lo esperado, ya que no había biomasa en el medio o bien, se inactivó mediante una esterilización (tratamiento 9). Así mismo, con estos controles se confirmó que la irradiación de la penca y fibra fue efectiva y que

ningún microorganismo nativo de dichos sustratos pudo interferir en los análisis de actividad enzimática.

En cuanto al contenido de proteína, se puede observar que en el medio con fibra como sustrato, la proteína secretada por el hongo aumentó de 14.30 a 31.60 mg L<sup>-1</sup> cuando se utilizó agua destilada estéril como medio líquido (tratamiento 3) en lugar de MME (tratamiento 2) como medio (Figura 33). En contraste, cuando la penca se usó como sustrato, el contenido de proteína fue 4 veces mayor en el medio con adición de minerales (tratamiento 5) que en el medio con únicamente agua destilada estéril (tratamiento 6).

Aunque el hongo liberó un mayor contenido de proteína al medio en el tratamiento con fibra y agua destilada estéril (tratamiento 3) que en el tratamiento 1 (fibra, MME y glucosa) y tratamiento 2 (fibra, MME y sin glucosa), la actividad lacasa alcanzada fue la menor de los 6 tratamientos, indicando que la fuente de carbono disponible, induce también la producción de otras enzimas diferentes a la lacasa (Chawachart *et al.*, 2004), caso opuesto a lo observado con penca y agua destilada estéril (tratamiento 6), donde la concentración de proteína fue la menor de los 6 tratamientos (10.70 mg L<sup>-1</sup>).

Al respecto, algunos estudios documentan que las lacasas son activadas cuando hay un agotamiento del sustrato, debido al consumo de éste por el hongo o se encuentra limitado desde el inicio de la fermentación (Guillén *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2005), tal como en los tratamientos 3 y 6. Sin embargo, los nutrientes que posee la penca de manera natural, son suficientes para lograr una alta actividad enzimática y un menor contenido de proteína (tratamiento 6), respecto al tratamiento con penca, glucosa y minerales (tratamiento 4), así como del tratamiento con penca y minerales (tratamiento 5), cuyos nutrientes, además de los azúcares reductores de la penca, favorecieron la producción de otras enzimas que fueron liberadas al medio para utilizar el sustrato, generando por lo tanto, valores más altos de proteína en los tratamientos 4 y 5.

Para los controles 9, 10 y 11, aunque no presentaron actividad lacasa, sí se encontró proteína extracelular que puede proceder de las enzimas que se inactivaron en el momento de la esterilización del micelio, o bien, de la microbiota natural del agave, que también fue inactivada durante su irradiación.

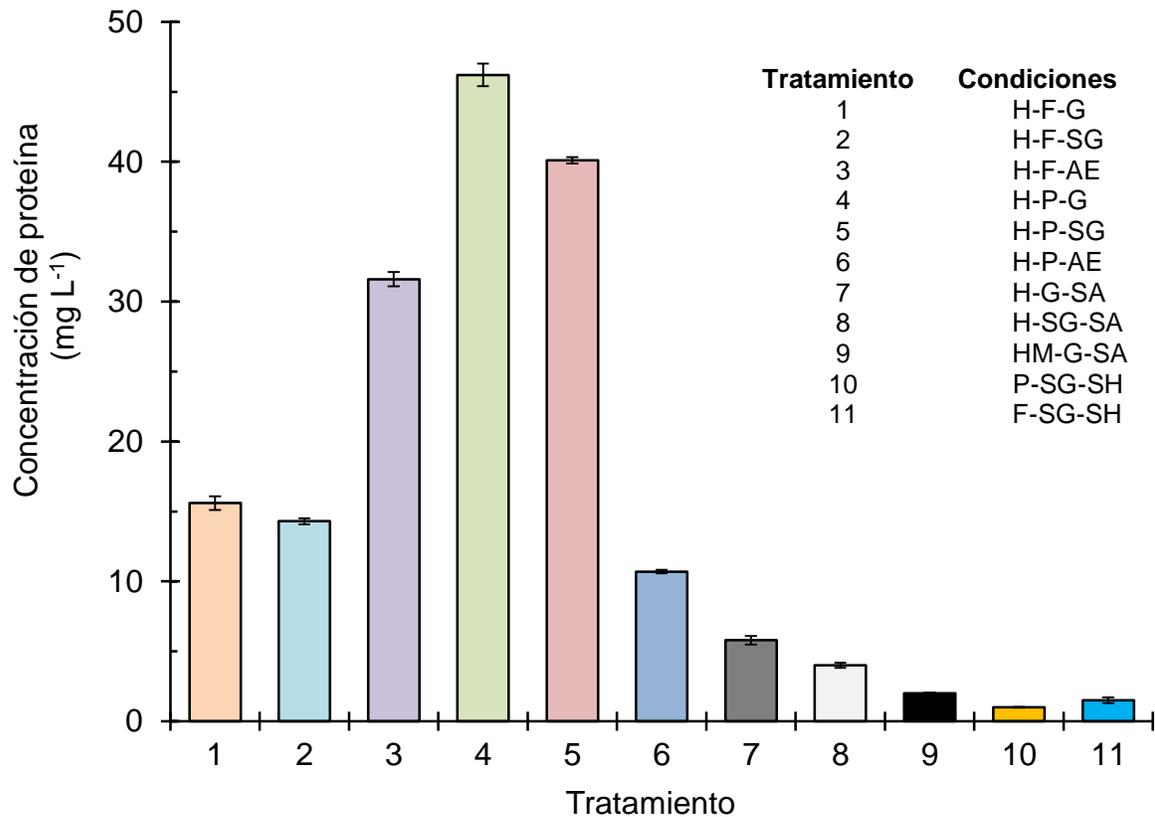


Figura 33. Efecto de la composición del medio sobre el contenido de proteína extracelular de *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm; tiempo de incubación: 120 h. H: Hongo; F: Fibra; G: Glucosa en el MME; SG: Sin glucosa en el MME; AE: Agua estéril como medio; P: Penca; SA: Sin agave; HM: Hongo muerto; SH: Sin hongo

Finalmente, la mayor actividad específica ( $p \leq 0.05$ ) se obtuvo cuando *P. ostreatus* se cultivó con penca y agua destilada estéril (tratamiento 6) con un valor de  $14.68 \text{ U mg}^{-1}$ , pero al comparar la actividad específica obtenida con el tratamiento 1 ( $10.32 \text{ U mg}^{-1}$ ) y el tratamiento 2 ( $8.31 \text{ U mg}^{-1}$ ), se puede observar que la adición de glucosa al MME no provocó cambios significativos ( $p > 0.05$ ); lo mismo ocurrió en la actividad específica encontrada entre el tratamiento 4 ( $4.89 \text{ U mg}^{-1}$ ) y tratamiento 5 ( $3.80 \text{ U mg}^{-1}$ ), de

manera que los cambios significativos ( $p \leq 0.05$ ) se obtuvieron cuando se utilizó agua destilada estéril en lugar de MME (Figura 34). Este cambio en la composición del medio, posiblemente influyó en la producción de una isoforma de la lacasa más activa, utilizando penca como sustrato y agua destilada estéril como medio de cultivo.

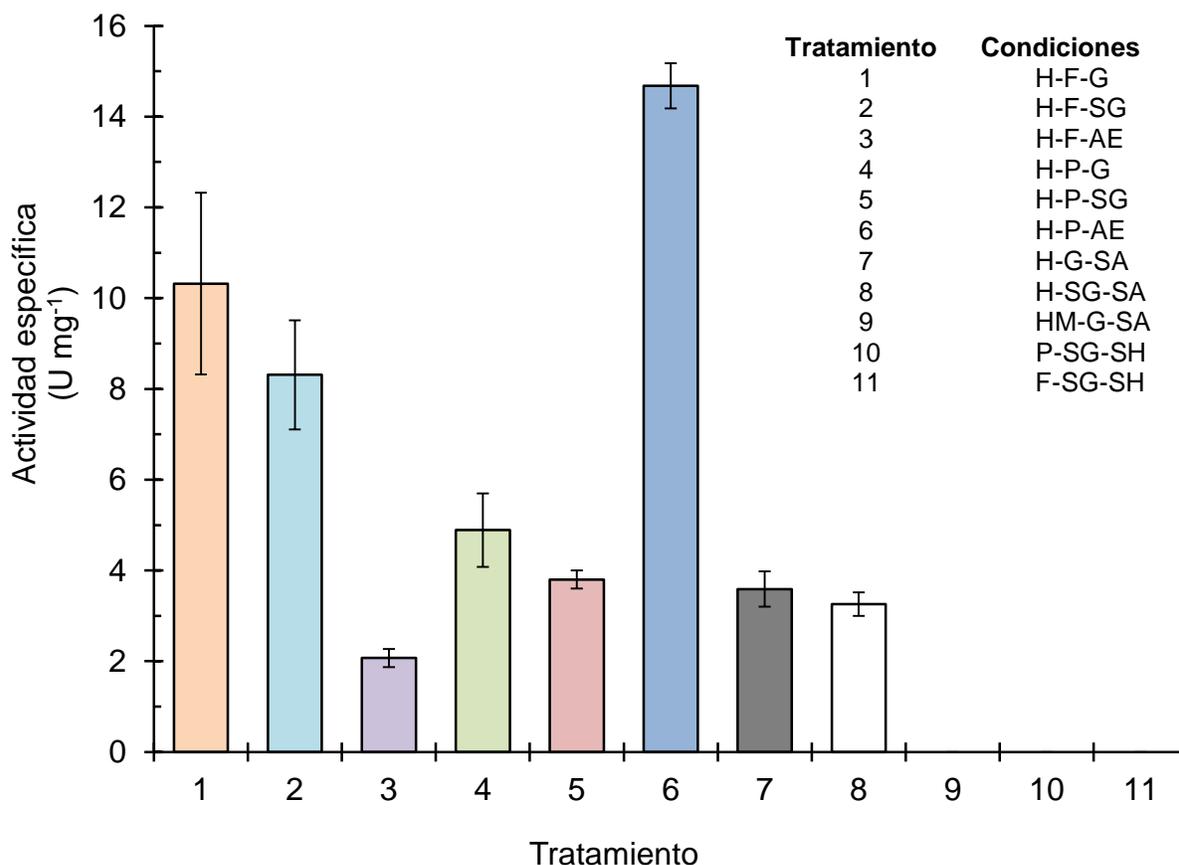


Figura 34. Efecto de la composición del medio sobre la actividad específica de las lacasas de *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sumergida. Temperatura de incubación: 29 °C; agitación: 120 rpm; tiempo de incubación: 120 h. H: Hongo; F: Fibra; G: Glucosa en el MME; SG: Sin glucosa en el MME; AE: Agua estéril como medio; P: Penca; SA: Sin agave; HM: Hongo muerto; SH: Sin hongo

### 6.5 Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* en fermentación en estado sólido

La investigación sobre la selección de un sustrato adecuado para la eficiente producción de lacasas, se ha centrado principalmente en el aprovechamiento de residuos agroindustriales para su aplicación en bioprocesos. Además de proporcionar

sustratos alternativos, esta fuente de residuos ayuda en la solución de problemas de contaminación (Rodríguez *et al.*, 2003).

El proceso de fermentación en estado sólido (FES), ha demostrado ser particularmente adecuado para la producción de enzimas de hongos filamentosos (Rodríguez *et al.*, 2003), debido a que reproduce las condiciones a las que estos hongos crecen en la naturaleza (Pandey *et al.*, 1999). Además, la FES ofrece algunas ventajas sobre la FESUM, como ser una técnica más simple y de menor costo. Sin embargo, la producción enzimática bajo este sistema se ve limitada por problemas encontrados en el control de diferentes parámetros como el pH, temperatura, agitación, aireación y transferencia de oxígeno (Rodríguez *et al.*, 2003).

En esta investigación, la mayor actividad enzimática cuando se usó fibra como sustrato, fue de  $45.43 \text{ U L}^{-1}$  a las 120 h de cultivo, mientras que tiempos prolongados de fermentación, resultan en una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la producción enzimática. Comparado con el uso de fibra, una actividad enzimática menor se encontró cuando se utilizó penca como sustrato, obteniendo una actividad lacasa de  $3.18 \text{ U L}^{-1}$  a las 120 h y  $6.96 \text{ U L}^{-1}$  a las 480 h de fermentación (Figura 35). Es notable que el aumento en la secreción de lacasas no se lograra al mismo tiempo de fermentación usando fibra o penca, lo cual se puede atribuir a la estructura de la partícula del sustrato. Mientras la fibra es relativamente fina, tiene un uso inmediato por el hongo, en tanto que la penca, al tener una geometría compleja, requiere de más tiempo para su degradación por el hongo, por lo que la actividad enzimática fue menor.

Se ha reportado que el micelio de *P. ostreatus* desarrollado en FES, produce una actividad máxima de  $20\,000 \text{ U L}^{-1}$  a las 528 h, utilizando salvado como sustrato humectado con vinaza en una relación 1:1 (Ramírez *et al.*, 2003). Estos resultados son 440.23 veces más grande que la actividad máxima alcanzada con fibra, y 2873.56 veces mayor que el experimento donde se utilizó la penca de agave, lo que se puede atribuir a la composición del sustrato. La vinaza demostró ser el mejor inductor en

comparación con otros residuos industriales evaluados, como el licor cervecero, levadura hidrolizada y melaza (Ramírez *et al.*, 2003).

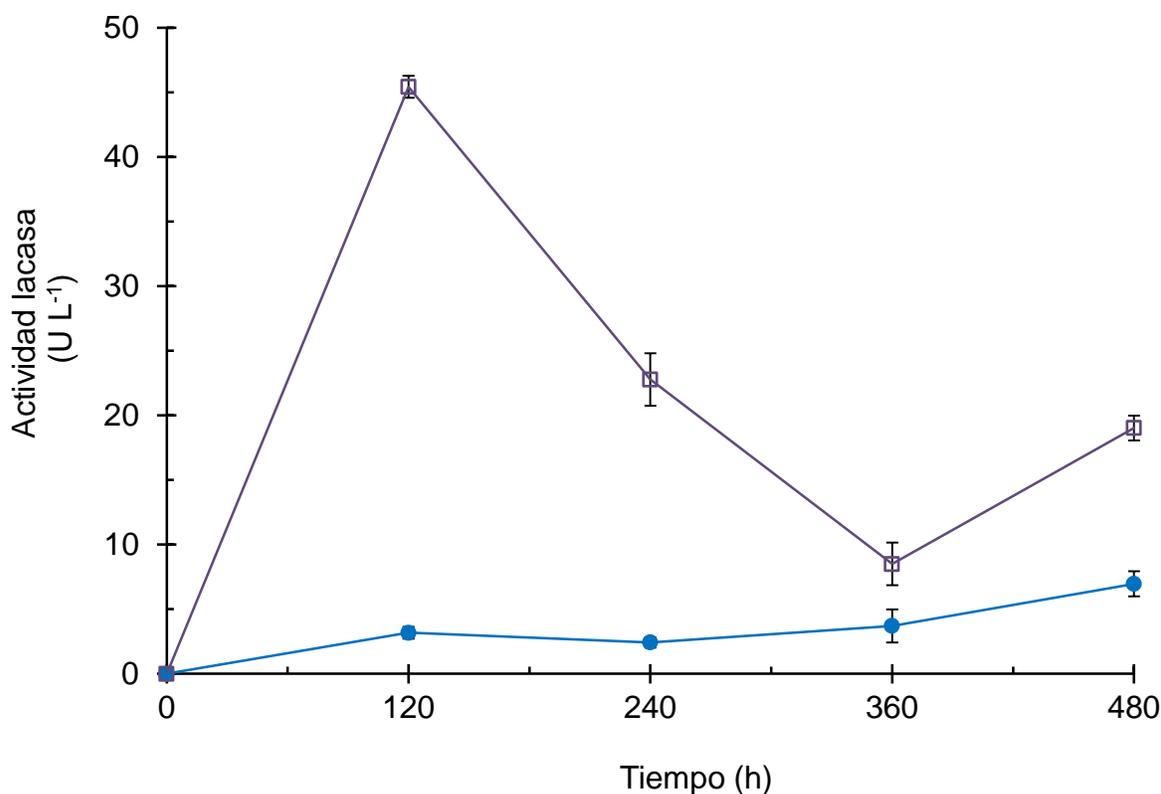


Figura 35. Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sólida. Temperatura de incubación: 29 °C. —□— Fibra, —●— Penca

En un reactor de bandeja en FES, cuando se utilizó salvado de cebada como soporte y el hongo *Trametes versicolor*, una actividad máxima de lacasas de 3 500 U L<sup>-1</sup> se encontró a las 432 h de fermentación. Esta alta actividad se alcanzó gracias a la composición lignocelulósica del salvado de cebada (21.4 % de lignina, 23 % de celulosa y 32.7 % de hemicelulosa) que proporcionó algunos nutrientes al hongo, y además, al uso de glucosa en el sistema de fermentación (14 g L<sup>-1</sup>) (Rodríguez *et al.*, 2003). Estos valores son 77.04 veces mayor al encontrado con fibra a las 120 h, y 502.87 veces mayor al logrado con penca a las 480 h de cultivo, lo que muestra que factores como el control de la fermentación, el tipo de microorganismo utilizado y la composición del sustrato influyen en la producción de lacasas.

Otra investigación realizada con el hongo *Coriolus versicolor* y cascarilla de arroz en FES, encontró la más alta actividad enzimática ( $1.98 \text{ U g}^{-1}$ ) a las 864 h de fermentación; se menciona también que cuando los niveles de carbono disminuyeron, la síntesis de lacasas fue inducida por los compuestos fenólicos contenidos en la cascarilla de arroz, conduciendo a un aumento en la producción de lacasa (Chawachart *et al.*, 2004). En el presente estudio, una actividad de  $2.27 \text{ U g}^{-1}$  se obtuvo a las 120 h de FES usando fibra, y de  $0.34 \text{ U g}^{-1}$  utilizando penca como sustrato a las 480 h de cultivo.

Por lo tanto, el uso de fibra como sustrato, permite alcanzar una actividad enzimática similar a la encontrada para *C. versicolor*, pero en menor tiempo de fermentación. Por el contrario, con la penca de agave, la actividad enzimática fue menor, aunque un aumento en la producción de lacasa ( $p \leq 0.05$ ) se observó a partir de las 240 h, el cual pudo deberse al aprovechamiento de nutrientes solubles (principalmente azúcares reductores) contenidos en este material vegetal.

La concentración de proteína producida con penca fue  $67.20 \text{ mg L}^{-1}$  a las 480 h de fermentación, mientras que con fibra fue de  $9.22 \text{ mg L}^{-1}$  a las 120 h (Figura 36). Tal vez esto se debió a la estructura más compleja de la penca, que indujo la producción de otras enzimas, así como de lacasa (Chawachart *et al.*, 2004).

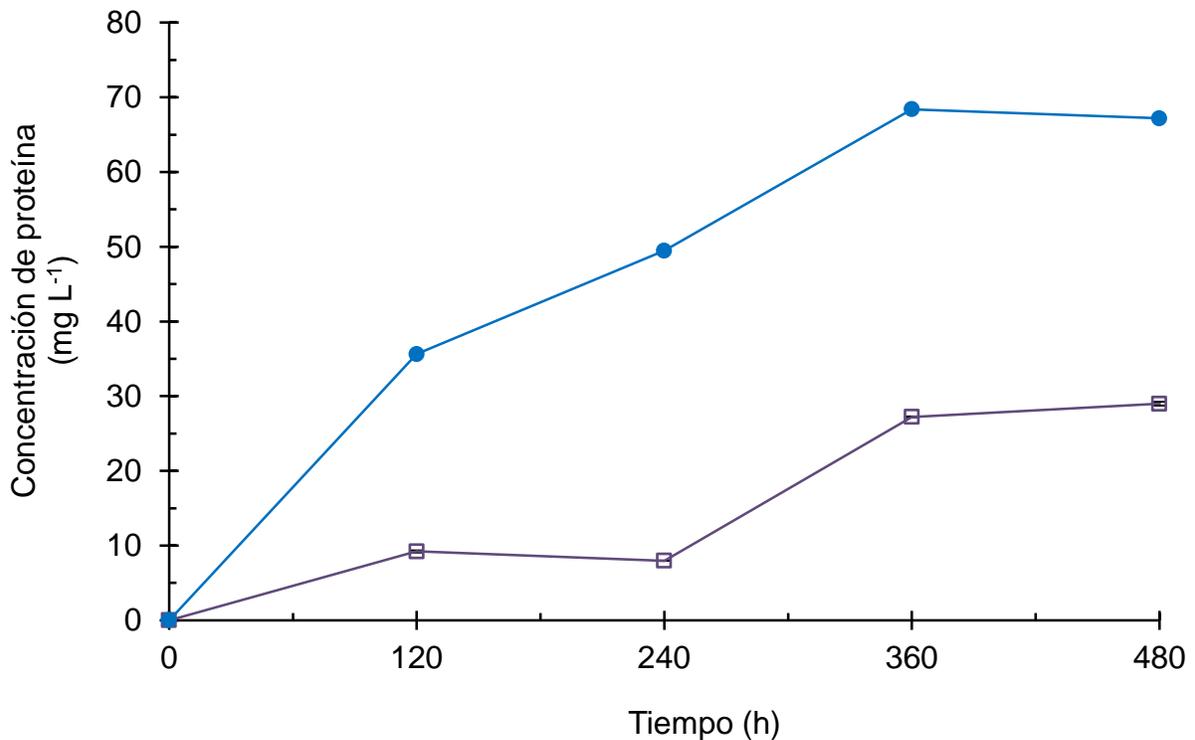


Figura 36. Concentración de proteína extracelular de *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sólida. Temperatura de incubación: 29 °C. —□— Fibra, —●— Penca

Para la actividad específica de la lacasa en medio sólido, los resultados difieren de lo reportado por Alonso *et al.*, (2007), quienes reportan una actividad específica de 52.8 U mg<sup>-1</sup> a las 480 h de FES, y en este trabajo se obtuvo una actividad específica de 4.99 U mg<sup>-1</sup> a las 120 h para el sistema con fibra, y de 0.10 U mg<sup>-1</sup> a las 480 h para la fermentación con penca, mostrando que bajo condiciones de FES, la penca induce enzimas 97.96 % menos activas que las producidas con fibra (Figura 37).

Considerando estos resultados, se puede observar que el sistema de producción que se utilice, influye directamente sobre la expresión enzimática (Alonso *et al.*, 2007), de manera que la fermentación en estado sólido (FES) utilizando los residuos de agave, no es un sistema efectivo para la producción de lacasas por *P. ostreatus*, por lo que el escalamiento se llevó a cabo bajo el sistema de fermentación sumergida (FESUM).

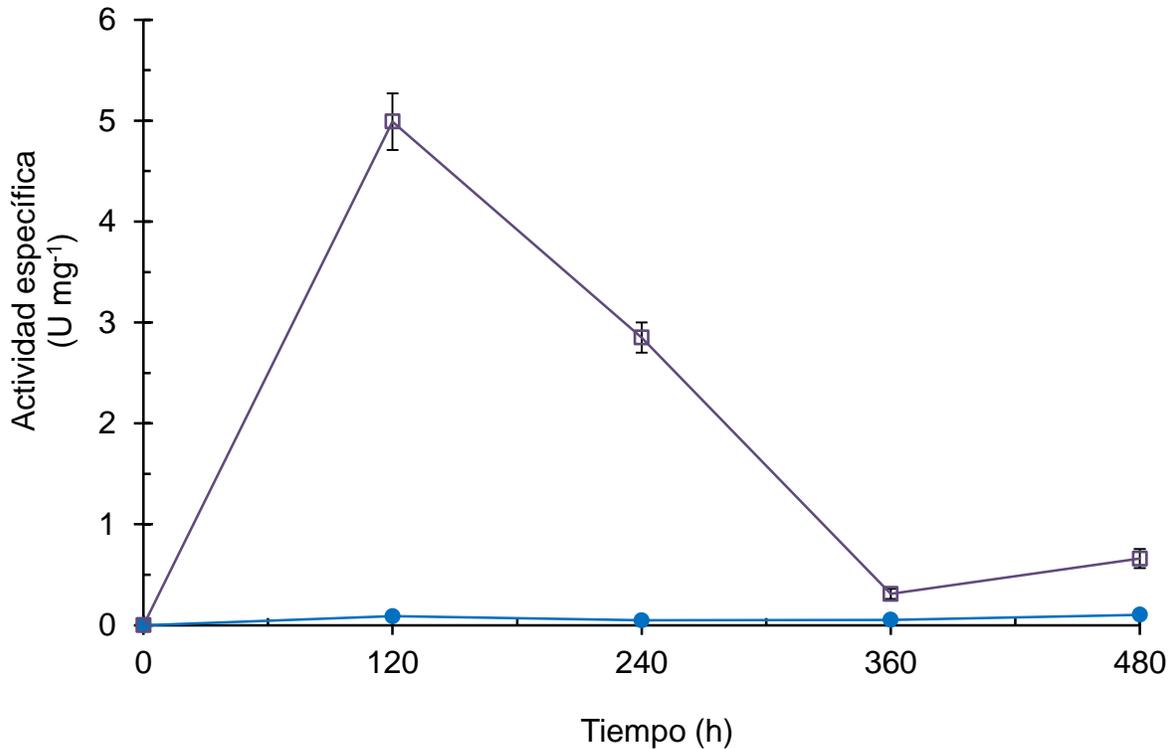


Figura 37. Actividad específica de las lacasas de *P. ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato en fermentación sólida. Temperatura de incubación: 29 °C. —□— Fibra, —●— Penca

En base a los resultados obtenidos en cada una de las cinéticas anteriores, se encontró que el sustrato adecuado para la máxima producción de lacasa por el hongo *P. ostreatus*, fue la penca de agave, a una concentración de 1 % (p/v) y utilizando como medio de cultivo, agua destilada estéril; así mismo, el tiempo necesario para alcanzar la mayor producción enzimática fueron 120 h, bajo el sistema de FESUM.

## 6.6 Producción de lacasas

### 6.6.1 Producción a nivel de matraz

En el escalamiento a nivel del matraz, pese a que las condiciones de producción de lacasa se extrapolaron de los resultados obtenidos en las cinéticas anteriores, los resultados no fueron satisfactorios. Es decir, aunque se utilizó penca a una concentración del 1 % (p/v), agua estéril como medio de cultivo, desprovisto de cualquier otro nutriente, 20 discos con micelio por cada 50 mL de medio, una temperatura de fermentación de 29 °C y 130 rpm para airear el cultivo (Figura 38), la

producción de lacasas disminuyó, pasando de  $156.0 \text{ U L}^{-1}$  a  $76.83 \text{ U L}^{-1}$ , en tanto que la proteína aumentó de  $10.70 \text{ mg L}^{-1}$  a  $35.35 \text{ mg L}^{-1}$ , de modo que la actividad específica descendió 6.7 veces. Este comportamiento se puede atribuir tanto al factor de la aireación como al mismo hongo, puesto que, aunque se tomó el micelio de una misma caja de cultivo para todos los matraces, la respuesta al medio no fue la misma, pues hubo matraces en donde tanto la actividad lacasa, como el contenido de proteína, fueron cercanos a los encontrados en las primeras cinéticas, pero también hubo matraces en los que sucedió lo contrario. La aireación es un parámetro fundamental a considerar, pues aunque hubo una agitación constante (130 rpm), los resultados señalan que posiblemente no fue la adecuada para el volumen de fermentación manejado, causando que hubiera una mayor cantidad de proteína pero menos activa. Esto se puede confirmar con los resultados generados en los biorreactores, donde la aireación, al ser con aire saturado que provoca la formación de burbujas, favoreció la producción enzimática semejante a los primeros ensayos realizados en matraces Erlenmeyer, con un volumen de trabajo de 50 mL.



Figura 38. Producción de lacasa a nivel de matraz

### 6.6.2 Producción a nivel biorreactor

El crecimiento de *P. ostreatus* y la producción de lacasa a nivel biorreactor de laboratorio, dio resultados similares a los encontrados a pequeña escala (Cuadro 8).

Sin embargo, únicamente el primer ciclo de fermentación generó un alta producción enzimática, de  $127.42 \pm 1.73 \text{ U L}^{-1}$ , valor que es próximo a las  $156.00 \text{ U L}^{-1}$  obtenidas en matraces con un volumen de trabajo de 50 mL. En el segundo ciclo de fermentación, la actividad lacasa disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ), siendo 11.64 veces menor comparado con el primer ciclo de producción, sugiriendo que otras enzimas distintas a la lacasa fueron producidas debido al cambio en la composición del sustrato, por lo que el contenido de proteína fue similar en ambos ciclos.

Para el tercer ciclo, tanto la actividad lacasa como la concentración de proteína, decayeron fuertemente; la actividad enzimática disminuyó de  $127.42$  a  $2.28 \text{ U L}^{-1}$ , mientras que la proteína descendió de  $11.91$  a  $1.31 \text{ mg L}^{-1}$ . Estos cambios en la actividad enzimática experimentados a lo largo de los ciclos de fermentación, han sido explicados por las diferencias en las fases de crecimiento fúngico (Guillén *et al.*, 1998; Tlecuítl *et al.*, 2008). Cabe mencionar que sólo se obtuvo alta producción de lacasa en el primer ciclo de fermentación, pues en el segundo ciclo fue menos del 10 % y después del tercer ciclo de producción, tanto la actividad enzimática como el contenido de proteína extracelular fueron nulos.

Cuadro 8. Actividad enzimática y contenido de proteína extracelular de *P. ostreatus* a diferentes ciclos de producción en un biorreactor de lecho fluidizado en fermentación sumergida utilizando penca de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

Ciclo (5 días)	Actividad lacasa ( $\text{U L}^{-1}$ )	Proteína extracelular ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Actividad específica ( $\text{U mg}^{-1}$ )
1	$127.42 \pm 1.73$	$11.91 \pm 1.25$	$10.69 \pm 1.27$
2	$10.94 \pm 0.46$	$10.05 \pm 0.63$	$1.08 \pm 0.10$
3	$2.28 \pm 0.34$	$1.31 \pm 0.00$	$1.74 \pm 0.26$
4	0.00	0.00	0.00

Estos resultados muestran que es factible realizar la producción de lacasas utilizando penca de agave como sustrato en un reactor de lecho fluidizado, en un solo ciclo de

fermentación de 120 h, razón por la que se seleccionaron dichas condiciones para la producción enzimática, para su posterior caracterización.

Por lo tanto, el aprovechamiento de los residuos de *Agave tequilana* Weber para la producción de lacasa, es una manera efectiva para reducir los costos de producción enzimática y al mismo tiempo, utilizar estos desechos eficientemente.

## **6.7 Purificación parcial de la lacasa**

### **6.7.1 Precipitación con sulfato de amonio**

En esta etapa inicial de purificación de la enzima, no fue necesario llevar a cabo una precipitación fraccionada como lo señalan algunos investigadores (Pezet 1998; Medina, 2003; Liu *et al.*, 2009; Guo Qing *et al.*, 2009), ya que al iniciar con una saturación de 40% de sulfato de amonio y centrifugar el extracto crudo, no se obtuvo precipitado. Lo mismo ocurrió con las siguientes saturaciones al 50, 60 y 70 %, por lo que se eligió una saturación inicial de sulfato de amonio al 90 %, realizando así un sólo fraccionamiento para la precipitación con sales, lo que sugiere que la cantidad de proteínas contaminantes es mínima.

Al extracto dializado (ED) obtenido de la precipitación con sales del extracto crudo, se le determinó la actividad enzimática, la cual fue de 2381.53 U L<sup>-1</sup>, en tanto que el contenido de proteína extracelular fue de 180.36 mg L<sup>-1</sup>. La actividad específica, por lo tanto, fue de 13.20 U mg<sup>-1</sup>, valor semejante al obtenido en la producción a nivel biorreactor. Estos resultados indican que la lacasa producida, es una enzima con un escaso contenido de impurezas. No obstante, las condiciones de crecimiento del hongo y su consecuente secreción de lacasas, siempre será un factor determinante en la cantidad de enzima producida (Guillén *et al.*, 1998).

### **6.7.2 Cromatografía de filtración en gel**

Este segundo paso de purificación tuvo como objetivo, separar las proteínas del extracto crudo precipitado, en base a su peso molecular, para posteriormente caracterizar la enzima fúngica producida.

En la Figura 39, se muestra el perfil de elución de la lacasa aislada del medio de cultivo de *P. ostreatus*, en el cual se revela el perfil de  $A_{280}$  como un pico simple. A esta longitud de onda, tienen su máximo de absorción los aminoácidos aromáticos como tirosina, fenilalanina y triptófano (Mathews *et al.*, 2002), de modo que este perfil es un indicador de la cantidad de aminoácidos aromáticos constituyentes de la enzima.

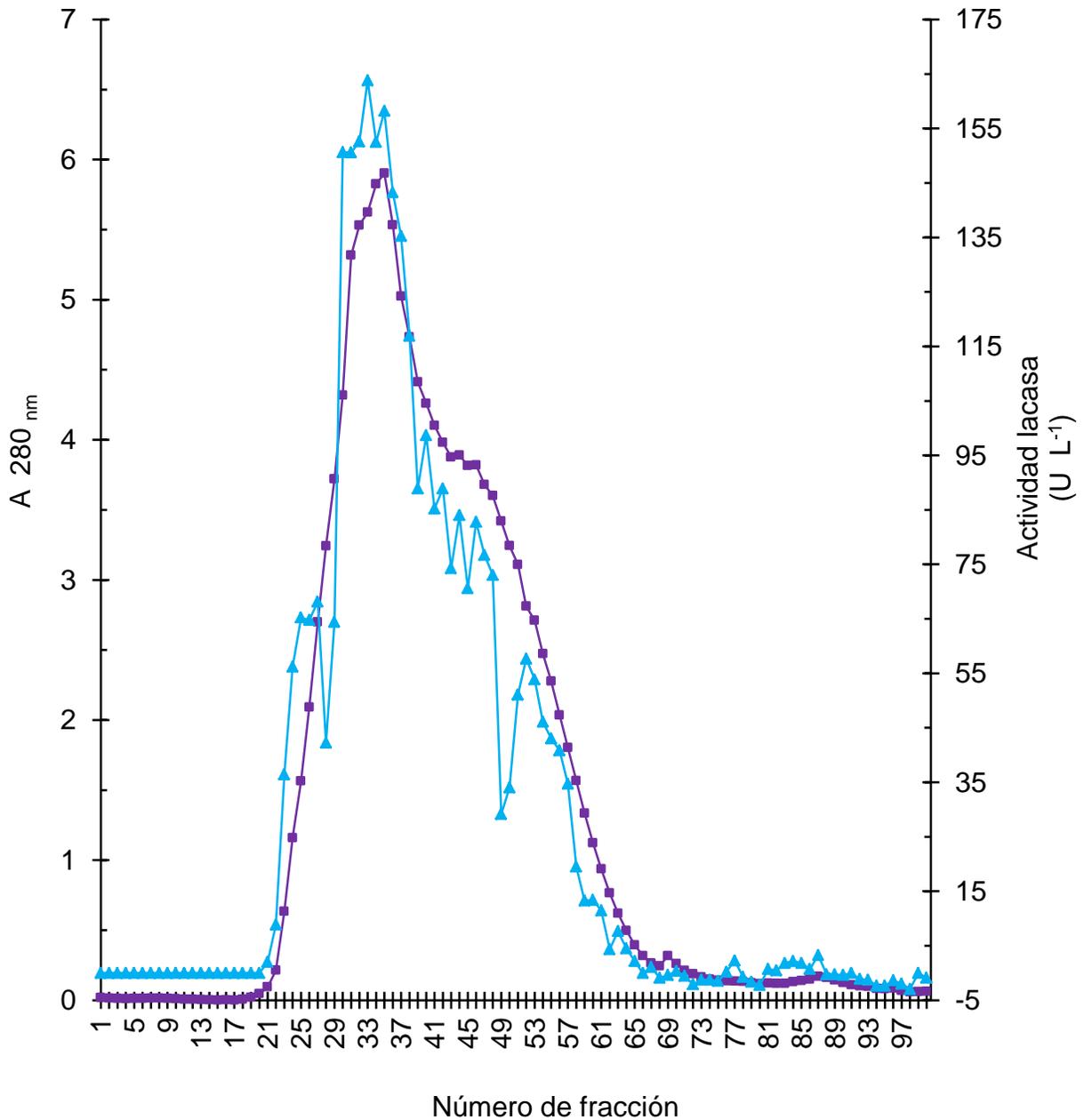


Figura 39. Perfil de elución y actividad lacasa en gel de Sephadex G-75. —■—  $A_{280}$ , —▲— Actividad lacasa

Las fracciones que tuvieron la mayor actividad enzimática fueron las fracciones 33 y 35, razón por la que fueron consideradas para su electroforesis en gel. El resto de las fracciones, se eliminaron.

Un perfil semejante encontraron Ramírez y colaboradores (2003) para la isoenzima Lacasa II de este mismo hongo, con la diferencia de que el tipo de fermentación que utilizaron fue en estado sólido, con salvado como sustrato y humectado con vinaza como inductor.

Un resumen de los resultados encontrados con los pasos de la purificación enzimática se presenta en el Cuadro 9. En éste, se muestra que la actividad específica del extracto crudo y del extracto dializado (ED) fue similar; lo que sugiere que la enzima se encontraba pura desde el inicio de su inducción.

Sin embargo, al llevar a cabo el fraccionamiento en filtración en gel, ocurrió una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la actividad específica de la lacasa, tendencia contraria a la que se reporta en la literatura (Desentis, 2006; Edens *et al.*, 1999; Jordaan *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2000; Tlecuitl *et al.*, 2008). Esta disminución posiblemente se debió a que el fraccionamiento en la columna con Sephadex G-75, causó la disgregación de la lacasa nativa, de tal manera que la actividad enzimática total, se vio afectada negativamente. La mayor actividad lacasa, se presenta cuando la lacasa se encuentra en forma nativa.

Cuadro 9. Purificación parcial de la lacasa de *P. ostreatus* utilizando penca de *Agave tequilana* Weber como sustrato.

Etapa de purificación	Actividad lacasa (U L <sup>-1</sup> )	Proteína extracelular (mg L <sup>-1</sup> )	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> )
Extracto crudo	176.83	15.35	11.51
Extracto dializado	2381.53	180.36	13.20
Fracción 33	163.82	141.34	1.15
Fracción 35	158.18	157.20	1.00

## 6.8 Caracterización de la lacasa parcialmente purificada

### 6.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (NATIVA-PAGE) se llevó a cabo para las fracciones 33 y 35 obtenidas en la cromatografía de filtración en gel, debido a que presentaron la mayor actividad enzimática, con 163.82 y 158.18 U L<sup>-1</sup>, respectivamente. Así mismo, también se realizó la corrida electroforética del ED obtenido después de la precipitación con sulfato de amonio.

Esta primera fase de la caracterización de la lacasa parcialmente purificada, se efectuó para conocer el peso molecular de las proteínas que aparecieron en cada fracción, las cuales se ilustran en la Figura 40. Se puede observar que en la fracción 33 (carriles 3 y 4), la fracción 35 (carriles 5 y 6) y en el ED (carril 7), aparecieron dos bandas localizadas a la misma altura en el gel, lo que significa la producción de dos isoformas de la lacasa, denominadas arbitrariamente Lac<sub>ag</sub>1 y Lac<sub>ag</sub>2.

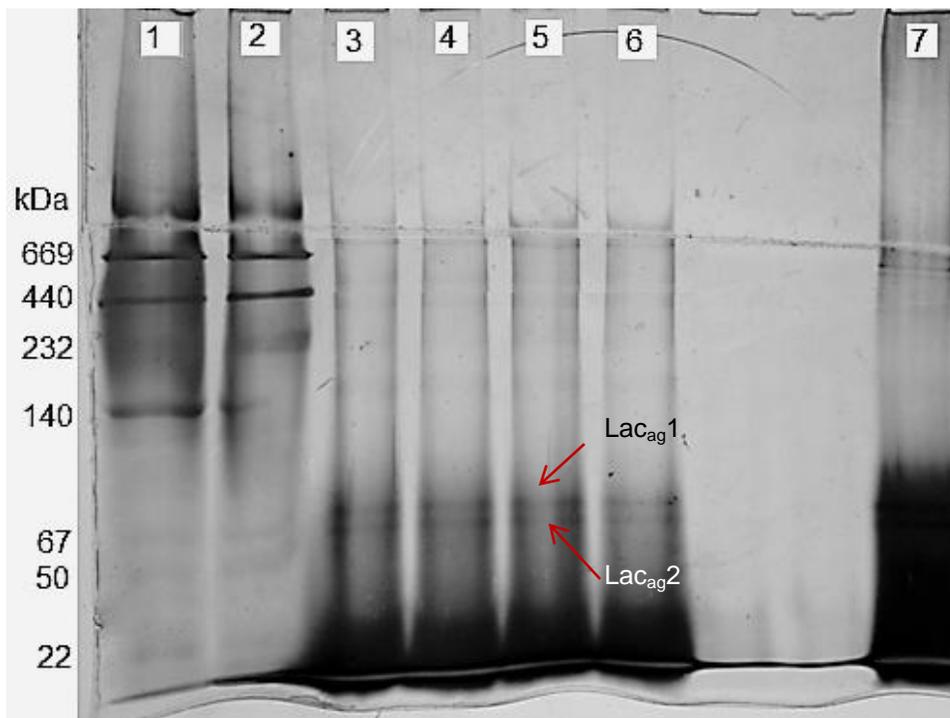


Figura 40. NATIVA-PAGE de la lacasa de *P. ostreatus* parcialmente purificada, producida con penca de *Agave tequilana* Weber como sustrato. Carriles 1 y 2: Marcadores; Carriles 3 y 4: Fracción 33; Carriles 5 y 6: Fracción 35; Carril 7: Extracto dializado.

Para el ED (carril 7), las dos bandas no se pueden observar nítidamente debido a la mayor concentración de las proteínas presentes. Al igual que los marcadores, las bandas del ED aparecen casi de inmediato durante la tinción del gel, a diferencia de las bandas de las fracciones 33 y 35, que demoraron en aparecer durante la tinción.

Es importante resaltar que desde la precipitación con sales del extracto enzimático, se obtuvieron dos bandas de proteína, mismas que aparecieron luego del fraccionamiento por tamaño molecular, lo que sugiere que al menos una de las isoformas sí es de lacasa, ya que se encontró actividad lacasa tanto en la fracción 33 ( $163.82 \text{ U L}^{-1}$ ) como en la fracción 35 ( $158.18 \text{ U L}^{-1}$ ). Sin embargo, es recomendable confirmar que ambas isoformas son de lacasa, a través de zimogramas, o bien, continuar con otros pasos de purificación, como el intercambio iónico, para la separación efectiva de ambas isoformas. Ahora bien, a partir de la distancia (medida manualmente) recorrida por cada uno de los marcadores (carriles 1 y 2) y la proteína de estudio parcialmente purificada (carriles 3 a 7), se determinó la movilidad relativa ( $R_f$ ) de cada uno de ellos, de acuerdo a la Ecuación 9. La distancia y los valores de  $R_f$ , tanto de las bandas de los marcadores, como de las dos isoformas encontradas, se presentan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Variables para determinar el peso molecular de las proteínas que aparecieron en el gel de electroforesis.

Marcador	PM (kDa)	Distancia (cm)	$R_f$ (X)	Log PM (Y)
Tiroglobulina	669	5.2	0.363	2.825
Ferritina	440	6.1	0.426	2.643
Catalasa	232	7.1	0.496	2.365
Lactato deshidrogenasa	140	8.4	0.587	2.146
Albúmina de suero bovino	67	11.1	0.776	1.826
Alcohol deshidrogenasa	50	11.9	0.832	1.698
Mioglobina	22	13.6	0.951	1.342
<b>Lac<sub>ag</sub>1</b>	<b>x</b>	<b>10.8</b>	<b>0.755</b>	<b>x</b>
<b>Lac<sub>ag</sub>2</b>	<b>x</b>	<b>11.1</b>	<b>0.776</b>	<b>x</b>

Con la representación del logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa (Rf), se generó la curva tipo que se ilustra en la Figura 41. A partir de la ecuación obtenida, se calculó el peso molecular de cada isoforma de lacasa parcialmente purificada. De esta manera se encontró que los pesos moleculares para la Lac<sub>ag</sub>1 y Lac<sub>ag</sub>2, fueron de 67.7 y 60.4 kDa, respectivamente. Los pesos moleculares de ambas isoformas, se encuentran dentro del intervalo reportado para las lacasas (25 a 100 kDa) (Galhaup *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2003; Shraddha *et al.*, 2011).

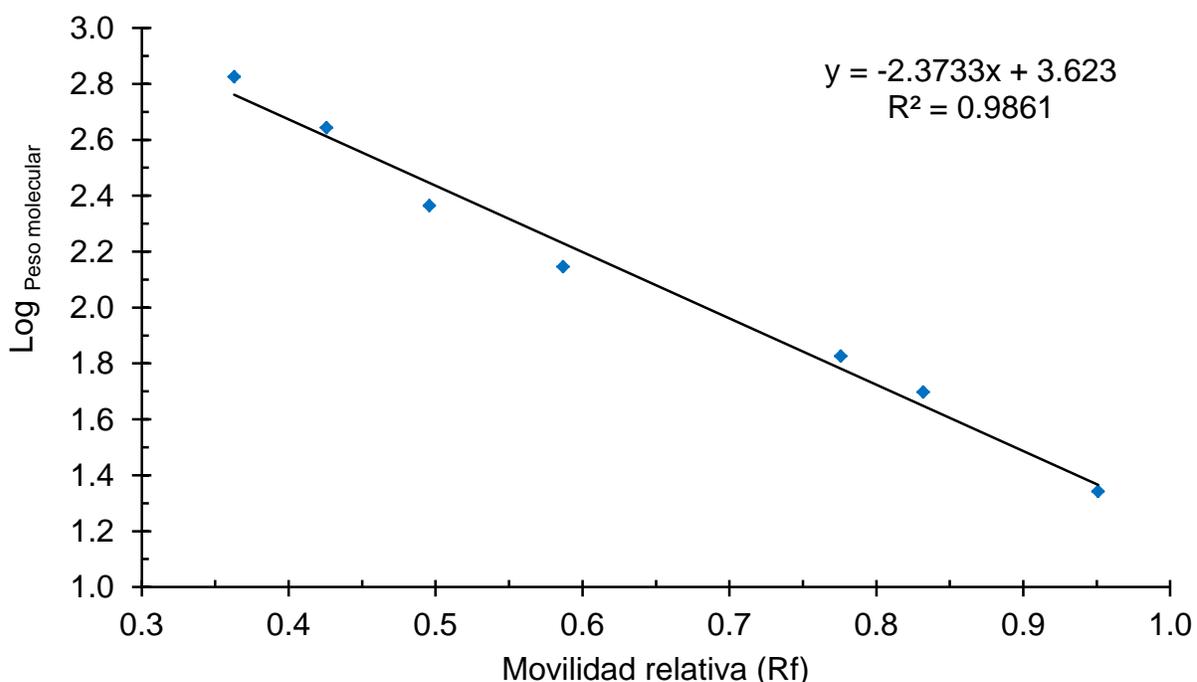


Figura 41. Curva tipo para determinar el peso molecular de las bandas proteicas de interés.

Con el software GelAnalyzer, fue posible obtener el perfil de intensidad de cada una de las bandas que aparecieron en cada carril (Figura 42). Así pues, se puede notar que en la fracción 35, la enzima se encontró más concentrada que en la fracción 33, ya que en esta última, la intensidad de las bandas de interés, fue menor. De igual manera, se puede notar que la definición de los picos de las bandas encontradas en la fracción 35, fue mejor que la resolución de los picos de la fracción 33, lo que se puede atribuir a la mayor concentración de proteína en la fracción 35. Lo anterior se confirmó con los resultados obtenidos mediante la técnica de Bradford, donde los valores para

la concentración de proteína extracelular fueron de 141.34 y 157.20 mg L<sup>-1</sup> para la fracción 33 y 35, respectivamente. Es conveniente resaltar que este programa determina la distancia de las bandas de interés, en unidades de píxeles y no en cm.

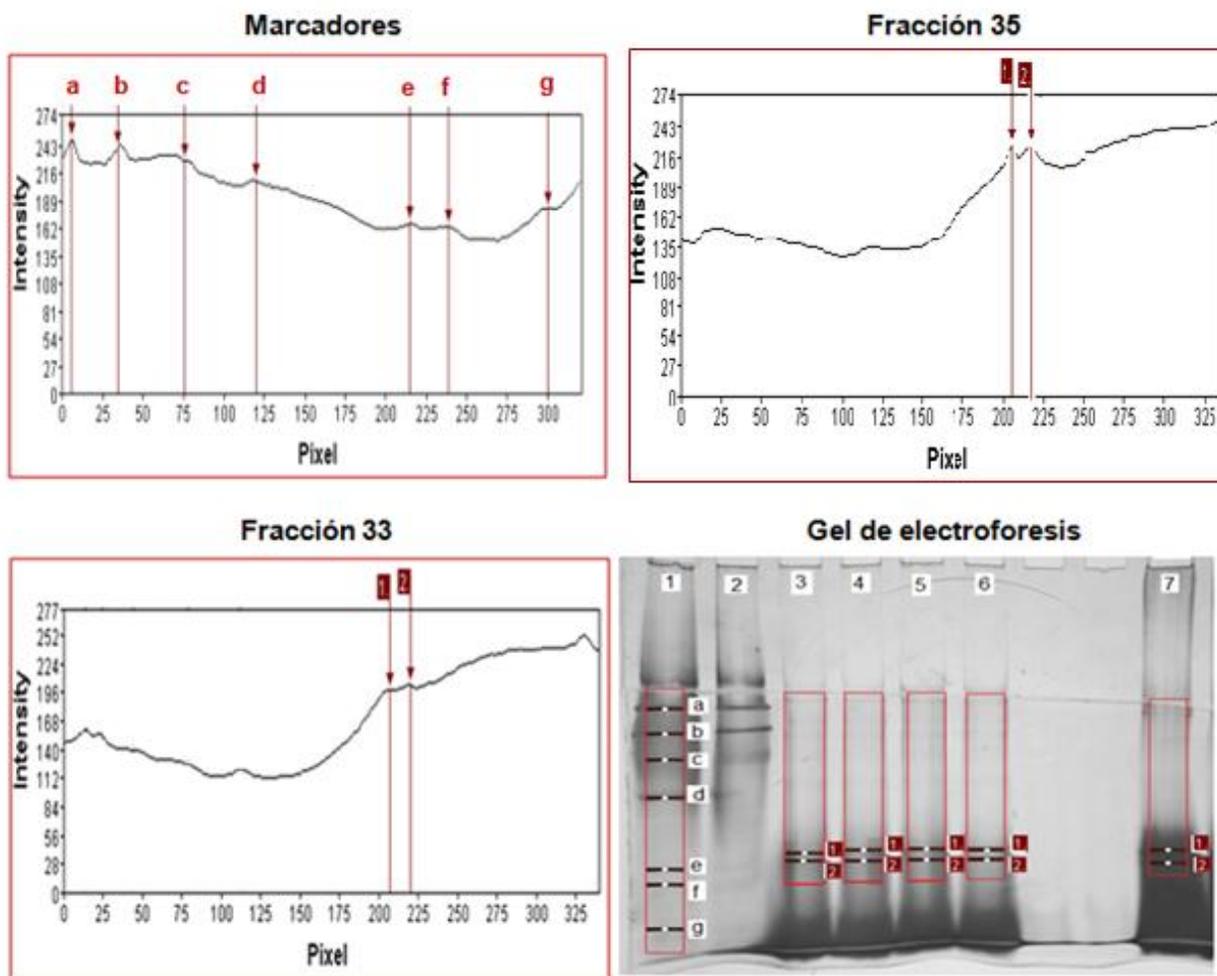


Figura 42. Perfil de intensidad de las proteínas presentes en el gel de electroforesis. a: Tiroglobulina (669 kDa); b: Ferritina (440 kDa); c: Catalasa (232 kDa); d: Lactato deshidrogenasa (140 kDa); e) Albúmina de suero bovino (67 kDa); f) Alcohol deshidrogenasa (50 kDa); g) Mioglobina (22 kDa). 1) Lac<sub>ag</sub>1; 2) Lac<sub>ag</sub>2.

En algunos análisis bioquímicos realizados a diversos hongos, se ha reportado que una especie individual, puede expresar diferentes isoformas de lacasa con diversas condiciones para la detección de su actividad, como el pH óptimo, especificidad de sustrato, peso molecular, localización celular y algunas condiciones de cultivo como la fuente de carbono y nitrógeno (Fernández-Larrea y Stahl, 1996).

Por su parte, Giardina *et al.*, (1999), mencionan que las lacasas son secretadas en múltiples isoformas, dependiendo de la especie fúngica, fase de desarrollo y condiciones ambientales, mientras que Palmieri *et al.*, (2000, 2003), reportaron que en *P. ostreatus*, la producción de isoformas de lacasa es regulada, además, por la presencia de cobre.

En esta investigación, no se utilizó cobre en el medio de cultivo como en otros estudios reportados en la literatura, debido a que se deseaba determinar únicamente el efecto del agave sobre la capacidad de producción de lacasa por *P. ostreatus*.

En la investigación realizada por Tlecuitl *et al.*, (2008), publicaron la producción de cuatro isoformas de lacasa (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, y L<sub>4</sub>) de *P. ostreatus* utilizando un medio líquido en FESUM compuesto por glucosa (10.5 g L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (5 g L<sup>-1</sup>), minerales, sulfato de cobre (0.25 g L<sup>-1</sup>) y 2,6-dimetoxifenol (2 mM) como sustrato. También refieren que la isoforma L<sub>1</sub> tuvo un peso molecular alrededor de 43.7 kDa y se produjo en mayor proporción durante toda la fase de crecimiento del hongo, mientras que las isoformas L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, y L<sub>4</sub> fueron producidas únicamente durante la fase estacionaria, entre las 408 y 456 h de fermentación. El peso molecular de estas tres isoformas no se determinó.

Las isoformas de los HPB, han mostrado un amplio intervalo de pesos moleculares (Baldrian 2006). Así, la isoforma de lacasa producida por *Gaumanomyces graminis* mostró un peso molecular de 190 kDa (Edens *et al.*, 1999), mientras que *Coriolus hirsutus* y *Coriolopsis rigida* produjeron una isoforma de 55 kDa (Tlecuitl *et al.*, 2008). Se ha documentado también que el hongo *P. ostreatus* produce, al menos, 8 isoformas de lacasa, 6 de las cuales han sido aisladas y caracterizadas (Giardina *et al.*, 1999; Palmieri *et al.*, 2003; Sannia *et al.*, 1986).

Palmieri *et al.*, (1993, 1997), encontraron en cultivos de *P. ostreatus* una isoforma de lacasa (POXC), cuyo peso molecular fue de 59 kDa, utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol. Este mismo grupo de investigadores pero en 1997, reportaron la

producción de otra isoforma para este mismo hongo, denominada POXA2, que mostró un peso molecular aproximadamente de 67 kDa. Por otro lado, dos isoformas de lacasa de *P. ostreatus* (POXA1b y POXA1w), tuvieron un peso molecular de 61 kDa, valor similar al encontrado para la isoforma POXC (Giardina *et al.*, 1999; Palmieri *et al.*, 1997). Palmieri *et al.*, (2003), encontraron dos isoformas más de *P. ostreatus*, llamadas POXA3a y POXA3b, las cuales fueron heterodímeros constituidos de grandes (61 kDa) y pequeñas (16-18 kDa) subunidades.

### **6.8.2 Efecto de la concentración de enzima parcialmente purificada, sobre la velocidad de reacción**

La determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de ésta, es el parámetro a través del cual se establece la cantidad de enzima que se va a utilizar para evaluar experimentalmente los parámetros cinéticos de  $K_M$  y  $V_{max}$ . Con esta información, se puede realizar una estimación teórica acerca de la velocidad de reacción y estabilidad de la enzima en condiciones determinadas (Castro, 2005).

Para la caracterización de la lacasa parcialmente purificada, se juntaron las fracciones 33 y 35, ya que presentaron la mayor actividad lacasa, con valores de 163.82 y 158.18  $U L^{-1}$ , respectivamente.

Los resultados encontrados muestran que, la tendencia en la velocidad de reacción, fue incrementar a medida que la concentración de enzima aumentó. Este comportamiento es lógico, ya que la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de la enzima, independientemente de la concentración de sustrato que se utilice. De este modo, se tiene que, si la concentración de enzima se duplica, entonces la velocidad de la reacción también se duplicará, tal y como se presenta en la Figura 43, donde se puede apreciar el comportamiento lineal entre la concentración de lacasa parcialmente purificada y la velocidad de reacción.

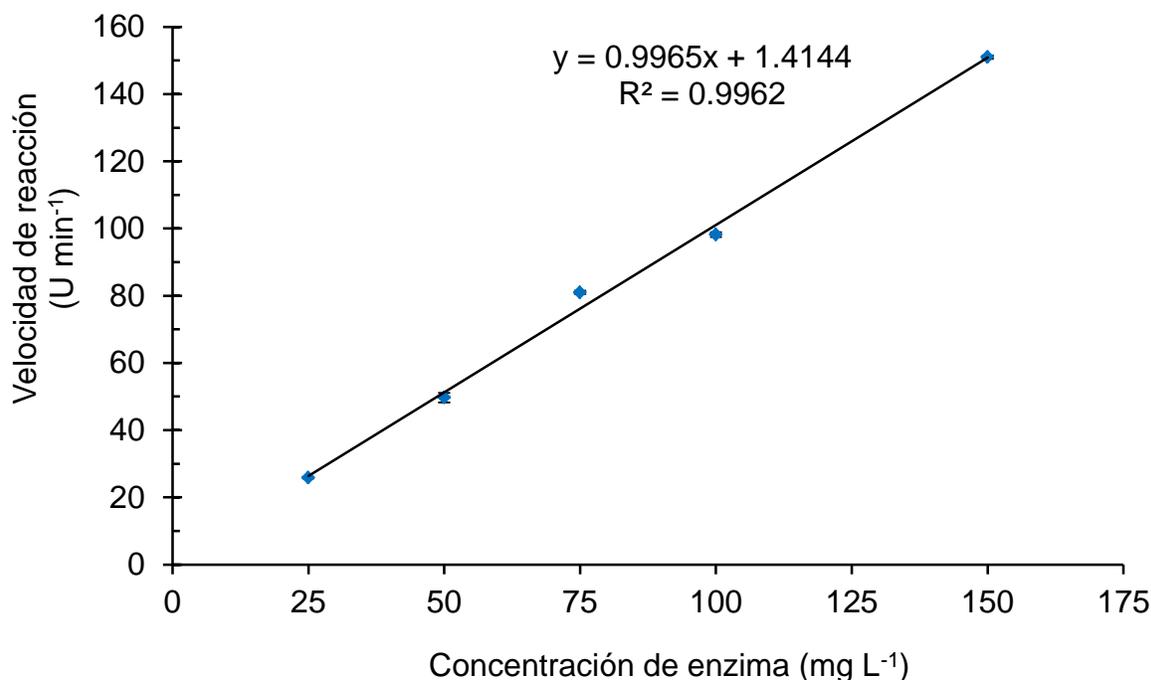


Figura 43. Relación de la velocidad de reacción con la concentración de lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada. \*Concentración de ABTS: 5 mM; Temperatura de reacción: 20 °C ± 2; pH: 4.5.

### 6.8.3 Efecto de la concentración de ABTS sobre la actividad lacasa

La determinación experimental de los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$ , como parámetros cinéticos, reviste particular importancia, pues a partir de ellos se puede conocer cómo es la afinidad de la enzima por el sustrato ( $K_M$ ) y a qué velocidad se transforma el complejo enzima-sustrato en producto ( $V_{max}$ ) (Castro, 2005).

En este sentido, a concentraciones de sustrato elevadas, la velocidad de reacción se aproxima asintóticamente a una velocidad máxima ( $V_{max}$ ), puesto que las moléculas de la enzima se encuentran saturadas; es decir, todas las moléculas de la enzima están ocupadas con el sustrato y se encuentran realizando el paso catalítico. En estas condiciones, la velocidad de reacción es de orden cero y prácticamente es independiente de la concentración de sustrato. Por el contrario, a concentraciones de sustrato muy bajas, la velocidad inicial de reacción es proporcional a la concentración de sustrato, y la reacción muestra esencialmente un comportamiento de primer orden (Acunzo y Galli, 2003) (Figura 44).

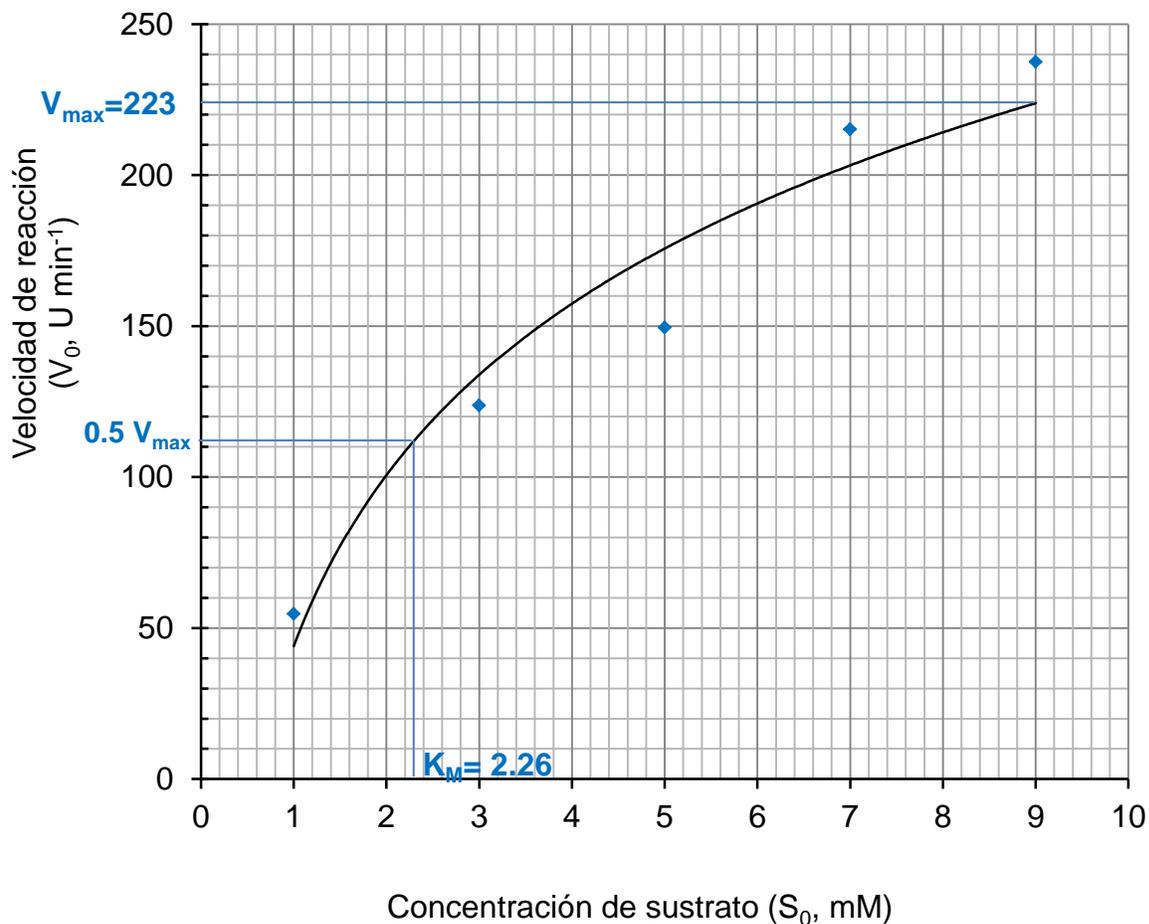


Figura 44. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada. \*Concentración de enzima parcialmente purificada: 150  $\text{mg L}^{-1}$ ; Temperatura de reacción: 20  $^{\circ}\text{C} \pm 2$ ; pH: 4.5.

El valor aproximado de  $K_M$  que se obtuvo gráficamente al representar la velocidad inicial frente a la concentración a la concentración inicial de sustrato, que sigue una función hipérbola rectangular, fue de 2.26 mM, lo que indica que es la concentración de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima.

Sin embargo, la ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la expresión de los datos experimentales, ya que favorecen la linealización de los datos. Una de las transformaciones más

adecuadas se obtiene tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max}[S]} \quad \text{Ecuación (9)}$$

Reordenando estos términos se tiene:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}[S]}$$

Así, la expresión final es  $1/V_o = (K_M/V_{\max})(1/[S]) + 1/V_{\max}$  (Mathew *et al.*, 2002).

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{\max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Ecuación (10)}$$

Esta última expresión corresponde a la ecuación de *Lineweaver-Burk*. Cuando  $1/V_o$  se representa gráficamente frente a  $1/[S]$ , se obtiene una línea recta. La pendiente de la recta es  $K_M/V_{\max}$ ; la intersección sobre el eje  $1/[S]$  es  $-1/K_M$  y la intersección en el eje  $1/V_o$  es  $1/V_{\max}$  (Figura 45).

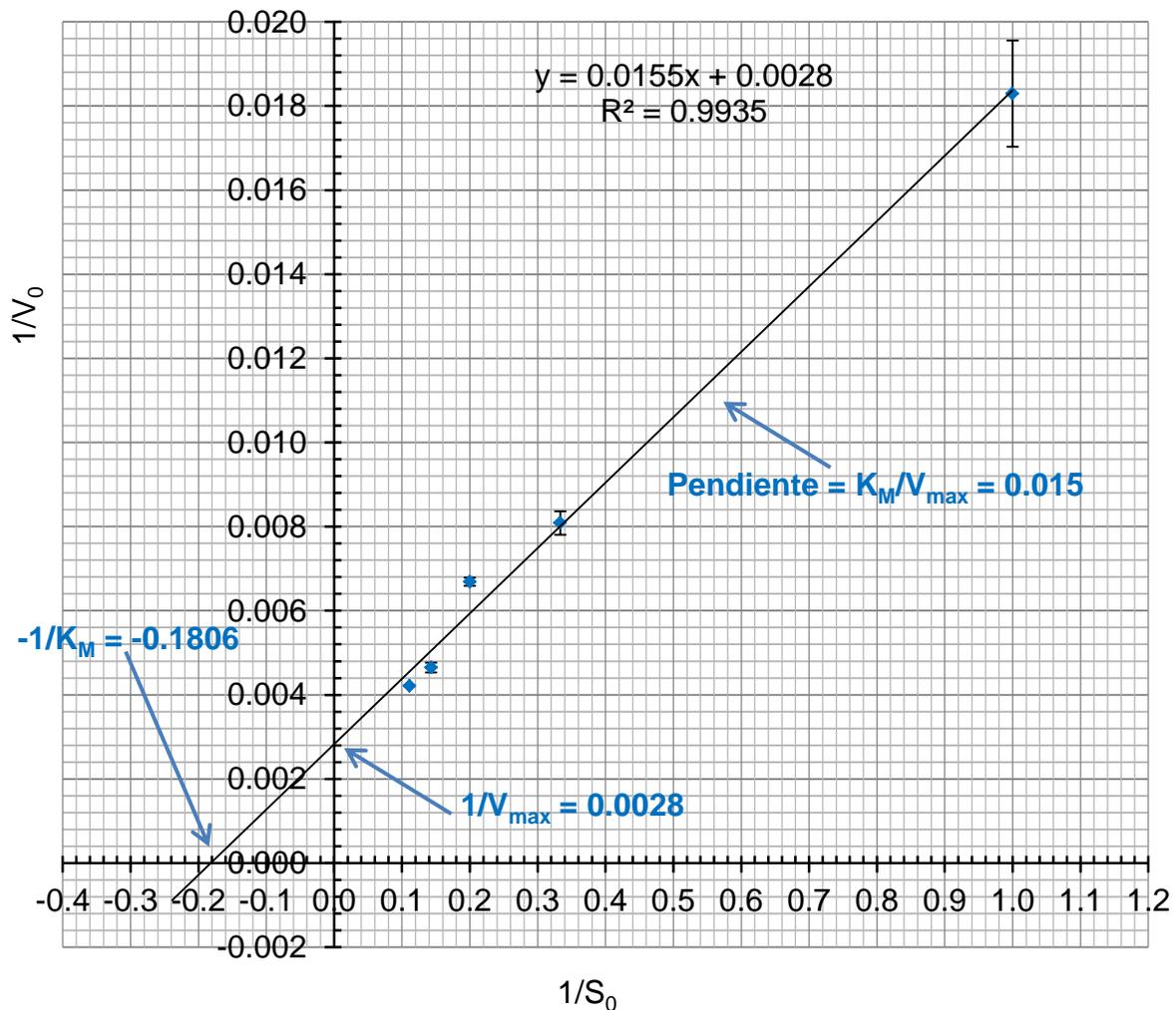


Figura 45. Representación del diagrama de Lineweaver-Burk para los datos obtenidos de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada.

Así, con esta transformación de la ecuación de Michaelis-Menten, gráficamente se obtuvo un valor para  $K_M$  de 5.54 mM y un valor de  $V_{max}$  de 357.14 U min<sup>-1</sup>.

La representación de doble recíproca, tiene la ventaja de permitir una determinación más exacta del valor de  $V_{max}$ , ya que en la representación de Michaelis-Menten, la  $V_{max}$  nunca se alcanza, sólo se obtiene su valor aproximado, puesto que es un valor límite a una concentración del sustrato infinita (Castro, 2005). Por ello, el diagrama de Lineweaver-Burk es frecuentemente utilizado para obtener un valor más preciso de las constantes cinéticas.

Además, la representación de Lineweaver-Burk proporciona una forma rápida de comprobar el cumplimiento de la cinética de Michaelis-Menten y permite evaluar con facilidad las constantes críticas. Sin embargo, un inconveniente de esta representación, es que suele requerir una extrapolación larga para determinar  $K_M$  (Mathews *et al.*, 2002). Por consiguiente, a veces se utilizan otras formas de representación de los datos experimentales. Una alternativa es representar  $V_0$  frente a  $V/[S]$ , que es la denominada representación de *Eadie-Hofstee* (Figura 46).

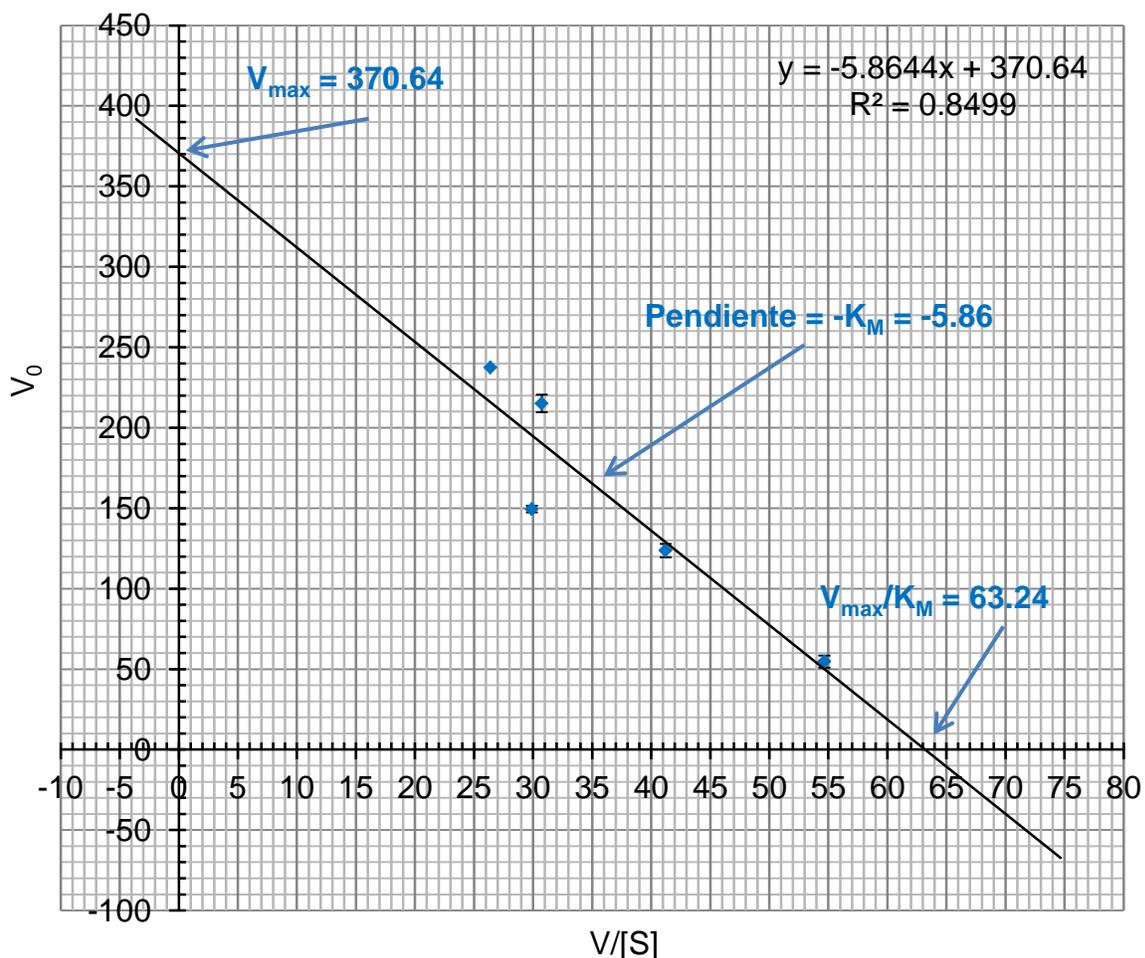


Figura 46. Representación del diagrama de Eadie-Hofstee para los datos obtenidos de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada.

En esta representación, la intersección en el eje  $V/[S]$  es  $V_{max}/K_M$ , y la intersección en el eje  $V_0$ , equivale al valor de  $V_{max}$ , de modo que los resultados para  $K_M$  y  $V_{max}$ , fueron 5.86 mM y 370.64  $U \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

Otro método gráfico para la representación de los datos experimentales, es la representación de Augustinsson para determinar  $K_M$  y  $V_{max}$ . En este método, la intersección en el eje  $[S]$  equivale al valor de  $-K_M$ , en tanto que el cruce en el eje  $[S]/V$ , corresponde a la relación de  $K_M/V_{max}$ . A partir de este diagrama, se encontró que el valor de  $K_M$  fue 7.25 mM y de  $V_{max}$  416.67  $U \text{ min}^{-1}$  (Figura 47).

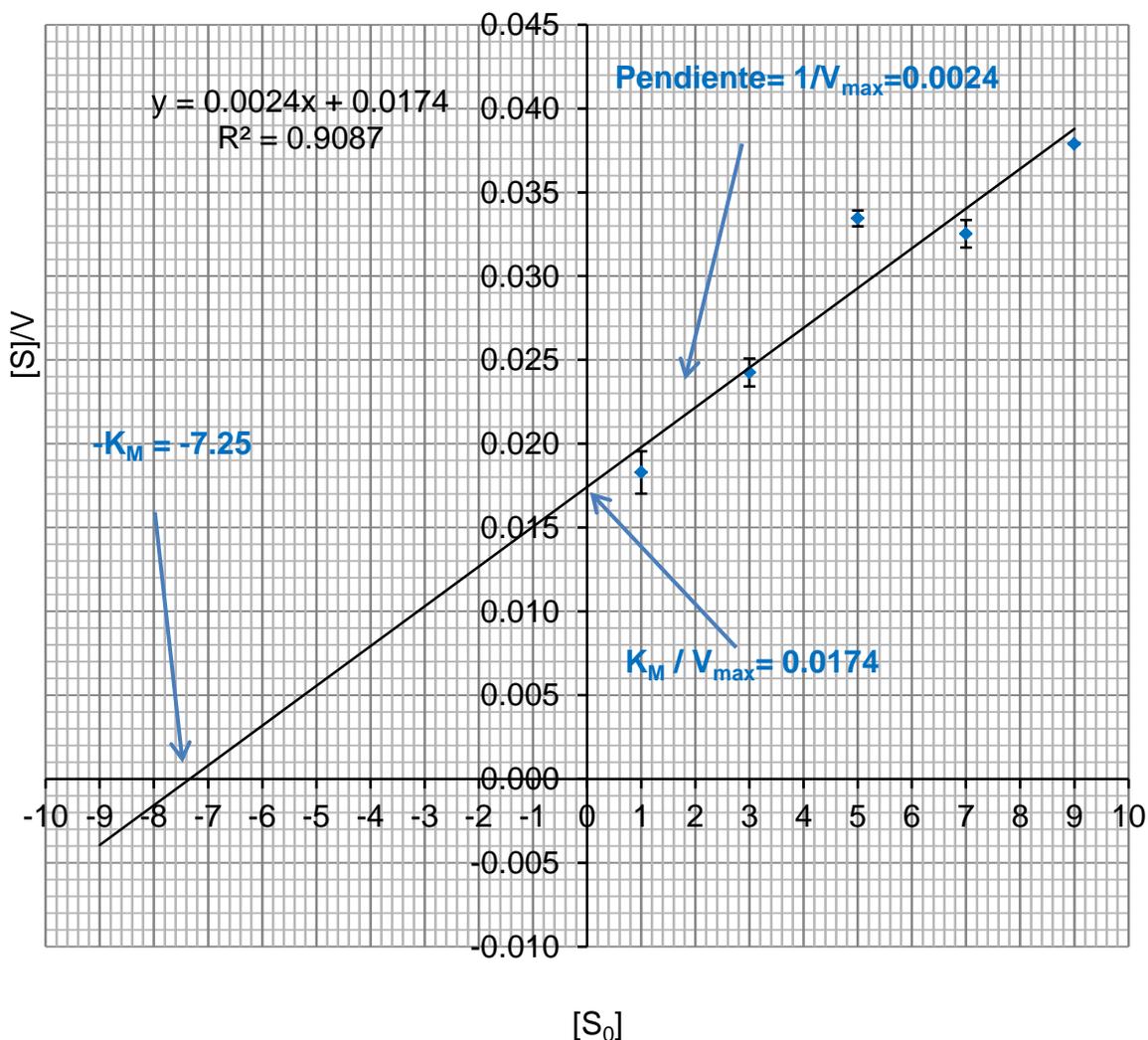


Figura 47. Representación del diagrama de Augustinsson para los datos obtenidos de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada.

En el Cuadro 11, se muestran los valores de las constantes cinética ( $K_M$  y  $V_{max}$ ) obtenidos con cada uno de los métodos gráficos antes señalados.

Cuadro 11. Valor de  $K_M$  y  $V_{max}$  obtenidos con diversos métodos gráficos.

Método	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (U min <sup>-1</sup> )
Michaelis-Menten	2.26	223.0
Lineweaver-Burk	5.54	357.14
Eadie-Hofstee	5.86	370.64
Augustinsson	7.25	416.67

Debido a que la representación de Lineweaver-Burk es el diagrama comúnmente utilizado, los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  obtenidos con esta herramienta, se utilizaron para compararlos con aquéllos reportados por otros investigadores. Así mismo, con el valor de  $V_{max}$ , se obtuvo el parámetro de  $k_{cat}$ , cuyo cálculo se realizó de la siguiente manera:

- La  $V_{max}$  obtenida del diagrama de Lineweaver-Burk fue:  $V_{max} = 357.14 \text{ U min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$
- Si una unidad de actividad enzimática (1 U) se define como 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS oxidado por minuto, entonces:  $V_{max} = 357.14 \mu\text{mol}_{\text{ABTS}} \text{ min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ .
- La concentración de enzima total  $[E_t]$ , parcialmente purificada, fue de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  (equivalente a  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sin embargo, sólo se depositó 0.1 mL de la solución enzimática parcialmente purificada, porque no se disponía de gran volumen de ésta, de manera que la  $E_t$  fue de  $15 \mu\text{g}$  de proteína que reaccionaron en un volumen final de 1 mL.
- El peso molecular de la proteína parcialmente purificada, fue el promedio del peso molecular de las dos isoformas encontradas en la electroforesis en gel, de manera que la masa molecular fue entonces de 64.105 kDa (equivalentes a  $64.105 \mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$ ). Así, al dividir  $[E_t]$  entre el peso molecular promedio, se obtiene que la  $[E_t]$  es igual a  $0.2339 \mu\text{mol mL}^{-1}$ .
- Por lo tanto, el valor de  $k_{cat}$  fue:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]} = \frac{357.14 \frac{\text{micromoles}}{\text{min} * \text{mL}}}{0.2339 \frac{\text{micromoles}}{\text{mL}}} = 1526.88 \text{ min}^{-1} = 25.448 \text{ s}^{-1}$$

Ecuación (11)

El parámetro de  $k_{cat}$ , constituye una medida directa del número de moles de sustrato convertidos en producto por segundo, por lo que en ocasiones se denomina a la  $k_{cat}$  como número de recambio. Este parámetro se define una vez que el sustrato se encuentra unido al centro activo de la enzima (Mathews *et al.*, 2002).

En el Cuadro 12, se presentan las propiedades cinéticas de otras isoformas de lacasa producidas por distintas fuentes fúngicas.

Cuadro 12. Propiedades cinéticas de otras isoformas de lacasas fúngicas

Hongo	Sustrato	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	Referencia
UD4	ABTS	0.0123	778	Jordaan <i>et al.</i> , 2004
UD4	Guayacol	0.251	42.1	Jordaan <i>et al.</i> , 2004
<i>Rigidoporus lignosus B</i>	ABTS	0.080	535	Bonomo <i>et al.</i> , 1998
<i>R. lignosus D</i>	ABTS	0.049	578	Bonomo <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhizoctonia solani</i>	ABTS	0.052	42	Xu <i>et al.</i> , 1996.
<i>Rhus vernicifera</i>	ABTS	0.039	0.45	Xu <i>et al.</i> , 1996.
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXA1)	ABTS	0.09	5833	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
<i>P. ostreatus</i> (POXA1)	Guayacol	NA	NA	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
<i>P. ostreatus</i> (POXA2)	ABTS	0.12	NR	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
<i>P. ostreatus</i> (POXA2)	Guayacol	3.10	NR	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
<i>P. ostreatus</i> (POXC)	ABTS	0.28	266	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
<i>P. ostreatus</i> (POXC)	Guayacol	1.20	2.5	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
<i>P. ostreatus</i> (L <sub>1</sub> 1)	DMP	0.09	NR	Tlecuil <i>et al.</i> , 2008
<i>P. ostreatus</i> cepa 10969	ABTS	0.31	NR	Liu <i>et al.</i> , 2009
<b><i>P. ostreatus</i></b>	<b>ABTS</b>	<b>5.54</b>	<b>25.44</b>	<b>Este estudio</b>
<i>Trametes hirsutus</i>	Guayacol	0.75	NR	Eggert <i>et al.</i> , 1995
<i>Trametes sp.</i>	ABTS	0.025	NR	Xiao <i>et al.</i> , 2003
<i>Lentinula edodes</i>	ABTS	0.000557	NR	Liu <i>et al.</i> , 2009
<i>Trametes versicolor</i> (L1)	Siringaldazina	0.0286	NR	Minussi <i>et al.</i> , 2007

DMP: 2,6-dimetoxifenol; NA: la enzima no fue activa con el sustrato; NR: datos no reportados.

Se puede observar que el valor de  $K_M$  encontrado en este trabajo, es considerablemente mayor al reportado en otras publicaciones, con excepción del valor encontrado para la isoforma POXA2 de *P. ostreatus*. Este resultado no es favorable para la actividad enzimática, ya que un valor alto de  $K_M$ , indica que existe baja afinidad de la enzima por el sustrato (predominan las formas *enzima* y *sustrato* libres).

Una situación similar ocurrió con el número de recambio ( $k_{cat}$ ), pues los resultados sólo son comparables con la  $k_{cat}$  obtenida para el hongo UD4 (hongo no identificado), *Rhizoctonia solani*, *Rhus vernicifera* y *P. ostreatus* (isoforma POXC). El resto de los hongos enunciados en el Cuadro 11 presentaron una  $k_{cat}$  significativamente superior, aspecto que es deseable en una enzima, pues a mayor valor de la  $k_{cat}$ , la eficiencia catalítica será mejor. De esta manera, la lacasa producida por *P. ostreatus* utilizando la penca de agave como inductor, es una enzima que tiene baja actividad contra el ABTS, puesto que convierte pocos moles de este sustrato en producto, por unidad de tiempo ( $25.44 \text{ s}^{-1}$ ).

Respecto a la  $V_{max}$ , que se refiere a la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato, el valor encontrado ( $357.14 \text{ U min}^{-1}$ ) fue 3.30 veces menor que el reportado para la isoforma L<sub>1</sub>1 de *P. ostreatus* ( $1180 \text{ U min}^{-1}$ ) (Tlecuitl *et al.*, 2008), pero fue semejante a la  $V_{max}$  de la lacasa de *P. ostreatus* cepa 10969 ( $310 \text{ U min}^{-1}$ ). Por su parte, Castro (2005) obtuvieron una  $V_{max}$  de  $74 \text{ U min}^{-1}$  para la lacasa de *Miceliophthora termophila* clonada en *Aspergillus oryzae*. Para esta propiedad cinética, conviene que la enzima presente un alto valor de  $V_{max}$ .

Por lo tanto, la lacasa parcialmente purificada, es una enzima que transforma pocos moles de ABTS en producto, dada la baja afinidad de la enzima por el sustrato, pero dicha conversión se realiza en forma rápida; estas condiciones limitan su aplicación en algunas áreas como la textil, donde se requieren lacasas que puedan oxidar un gran número de moléculas del sustrato (colorantes) en forma rápida, para blanquear rápidamente el exceso de colorantes que se eliminan de las telas y así reducir tiempos de proceso, energía y agua (Acunzo *et al.*, 2002).

#### 6.8.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada, tuvo una temperatura óptima de 40°C (Figura 48), con una velocidad de reacción de 330.16 U min<sup>-1</sup>. Sin embargo, el aumento en la energía cinética dado por el incremento de la temperatura, ocasionó que la actividad enzimática disminuyera, de tal modo que al aumentar 10 °C a la temperatura óptima, la velocidad de reacción fue del 55.79 % respecto a la encontrada con 40 °C, mientras que a 60 °C, la velocidad de reacción sólo fue del 3.33 %, valores que indican que temperaturas superiores a 40 °C, la enzima comienza a desnaturalizarse. Por el contrario, a temperaturas comprendidas entre 20 y 35 °C, la actividad enzimática osciló entre 246.83 y 304.16 U min<sup>-1</sup>, mientras que entre 45 y 60°C, la actividad enzimática varió entre 268.16 y 11 U min<sup>-1</sup>, debido que en el primer caso, la enzima permaneció íntegra en su estructura, es decir, no se desnaturalizó, pero las condiciones prevalentes en el medio no fueron adecuadas para la acción eficiente de la lacasa.

Algunos estudios comparativos respecto a la temperatura óptima, son los realizados por Tlecuitl *et al.*, (2008), quienes encontraron una temperatura óptima de 40 °C para la isoforma L<sub>1</sub> de *P. ostreatus*. Muñoz *et al.*, (1997), obtuvieron una temperatura óptima de 65 °C para la lacasa de *Pleurotus eryngii*. Por su parte, Liu y colaboradores (2009), reportaron una temperatura óptima de 50 °C para la lacasa de *P. ostreatus* cepa 10969, en tanto que Ramírez *et al.*, (2003) obtuvieron una temperatura óptima de 50 y 40 °C, para la lacasa I y II de *P. ostreatus*, respectivamente.

Para la isoforma Lcc1 de *Lentinula edodes* (Nagai *et al.*, 2002) y la isoforma de *Mauginiella* sp. (Palonen *et al.*, 2003), se encontró una máxima actividad a 40 °C. Tinoco *et al.*, (2001) encontraron que diversas cepas de *P. ostreatus* mostraron la mayor velocidad de reacción entre 30 y 40 °C, usando siringaldazina como sustrato.

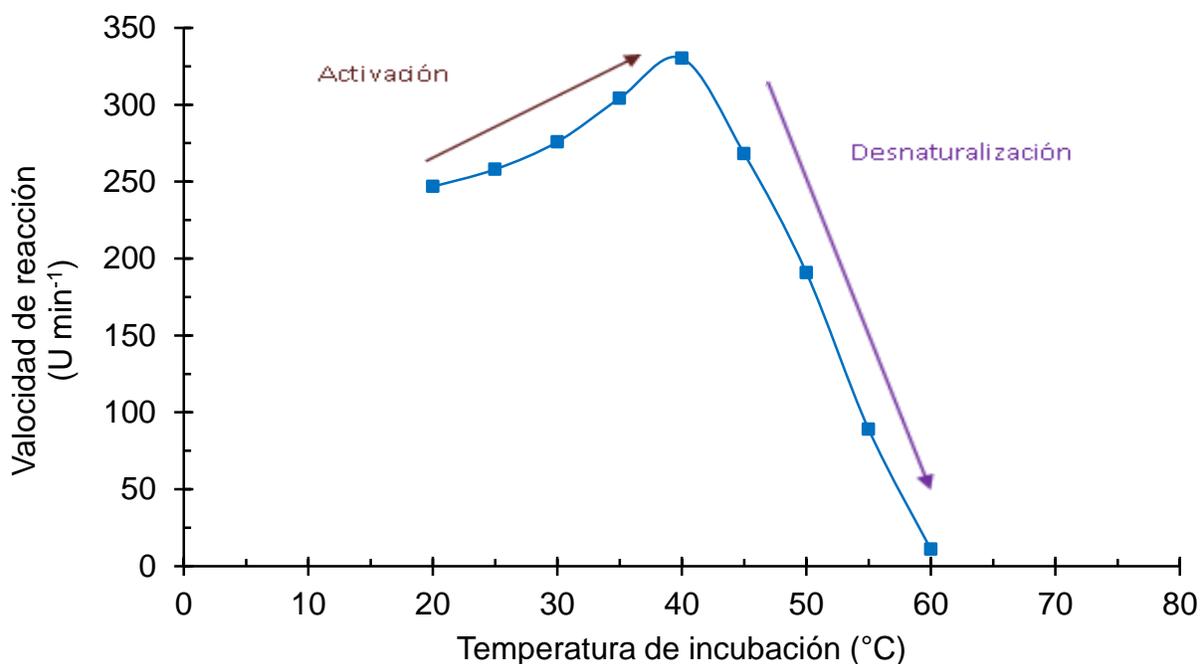


Figura 48. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada. \*Concentración de enzima parcialmente purificada: 150 mg L<sup>-1</sup>; concentración de ABTS: 9 mM; pH: 4.5.

Con las velocidades de reacción de la gráfica anterior, se realizó el cálculo de la energía de activación ( $E_a$ ), para lo cual se consideraron, además, las variables que se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Variables para el cálculo de la energía de activación ( $E_a$ )

Temp. (°C)	Temp. (K)	1/T	[E <sub>t</sub> ] (μmol mL <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (μmol s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> = V <sub>max</sub> / [E <sub>t</sub> ] (s <sup>-1</sup> )	Ln k <sub>cat</sub>
20	293	0.00341	0.2339	4.113	17.584	2.866
25	298	0.00336	0.2339	4.300	18.383	2.911
30	303	0.00330	0.2339	4.597	19.653	2.978
35	308	0.00325	0.2339	5.069	21.671	3.075
40	313	0.00319	0.2339	5.502	23.522	3.157

Una unidad de actividad, se define como el aumento en 0.001 en la absorbencia por minuto.

Con estos valores, se construyó un gráfico de Arrhenius (Figura 49), debido a que la velocidad de una reacción enzimática, aumenta cuando se incrementa la temperatura.

Así, al graficar  $\ln k_{\text{cat}}$  frente a  $1/T$  para obtener la ecuación de la recta, el valor de la pendiente,  $m$ , es igual al valor absoluto de  $-E_a/R$ , cuyo valor fue de  $-1365.5$ , de acuerdo a la ecuación de la recta obtenida. Conociendo  $R$ , que es la constante de los gases ideales ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), se sustituyeron valores y se despejó  $E_a$ , deduciendo un valor de  $11352.767 \text{ J mol}^{-1}$  o bien,  $2.71 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . Este valor significa que se deben suministrar, cuando menos,  $2.71 \text{ Kcal}$  (en forma de calor) para iniciar la actividad catalítica de un mol de enzima y así comenzar la reacción. Con el uso de la enzima como catalizador, la  $E_a$  disminuye, en tanto que sin el uso de éste, se requiere de una  $E_a$  mayor. Cuanto menor sea la  $E_a$ , la energía requerida para que la reacción entre en el estado de transición (conversión de sustrato en producto) será menor y por lo tanto, la eficiencia catalítica será mayor.

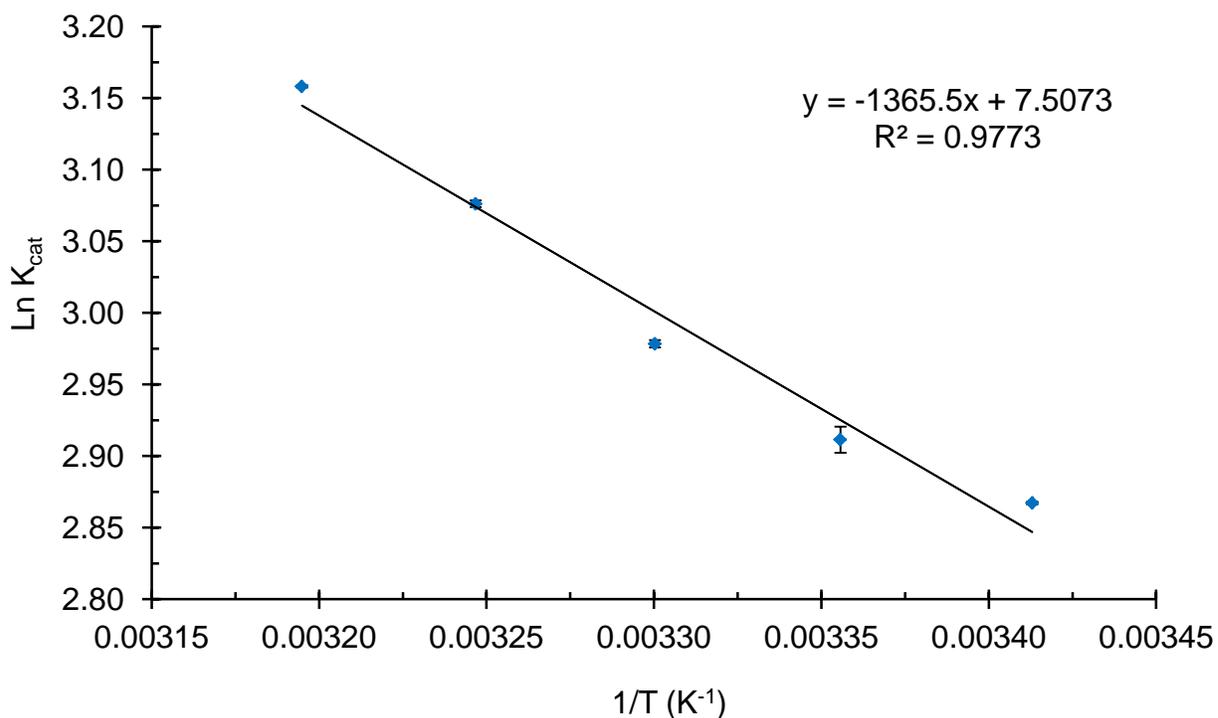


Figura 49. Gráfico de Arrhenius para la energía de activación de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada. \* Concentración de enzima parcialmente purificada:  $150 \text{ mg L}^{-1}$ ; concentración de ABTS:  $9 \text{ mM}$ ; pH:  $4.5$ .

En este estudio, pese a que la  $E_a$  de la lacasa fue relativamente baja, la eficiencia catalítica no fue favorable ( $k_{cat}$  de  $25.448 \text{ s}^{-1}$ ).

En cuanto al cálculo de la energía de desnaturalización ( $E_d$ ), el procedimiento utilizado fue el mismo que para el cálculo de la  $E_a$ , pero sustituyendo los valores de  $V_{max}$  obtenidos a las temperaturas de 45, 50, 55 y 60 °C, los cuales se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Variables para el cálculo de la energía de desnaturalización ( $E_d$ )

Temp. (°C)	Temp. (K)	1/T	[E <sub>t</sub> ] (μmol mL <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (μmol s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> = V <sub>max</sub> / [E <sub>t</sub> ] (s <sup>-1</sup> )	Ln k <sub>cat</sub>
45	318	0.00314	0.2339	4.469	19.106	2.950
50	323	0.00310	0.2339	3.180	13.595	2.609
55	328	0.00305	0.2339	1.483	6.340	1.846
60	333	0.00300	0.2339	0.183	0.783	-0.244

Una unidad de actividad, se define como el aumento en 0.001 en la absorbencia por minuto.

Nuevamente, se construyó un gráfico de Arrhenius (Figura 50) para obtener la ecuación de la recta, donde el valor de la pendiente,  $m$ , es igual al valor absoluto de  $-E_d/R$ . De acuerdo a la ecuación de la recta obtenida con los datos experimentales, el valor de la pendiente fue de 21 793, de manera que al sustituir los valores de  $m$  y  $R$  y despejando  $E_d$ , se obtuvo un valor de  $181\,187.002 \text{ J mol}^{-1}$  ( $43.30 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ), resultado que señala que la lacasa parcialmente purificada, requiere 16 veces más energía para pasar al estado de transición y realizar la transformación de sustrato a producto, pues el aumento en la energía cinética dada por el incremento en la temperatura de incubación, desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas ocasionando su desnaturalización.

Tlecuitl *et al.*, (2008), reportaron una baja  $E_a$  ( $2.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ) y una alta  $E_d$  ( $12 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ) para la isoforma L<sub>1</sub>1 de *P. ostreatus*. La  $E_a$  es similar a la encontrada en la presente contribución, pero la  $E_d$  difiere de manera importante, lo que sugiere que la

lacasa inducida con penca de agave es menos termoestable que la estudiada por Tlecuítl *et al.*, (2008), debido a que requiere 3.6 veces más energía para pasar al estado de transición, a consecuencia de su desnaturalización a temperaturas superiores a 40 °C.

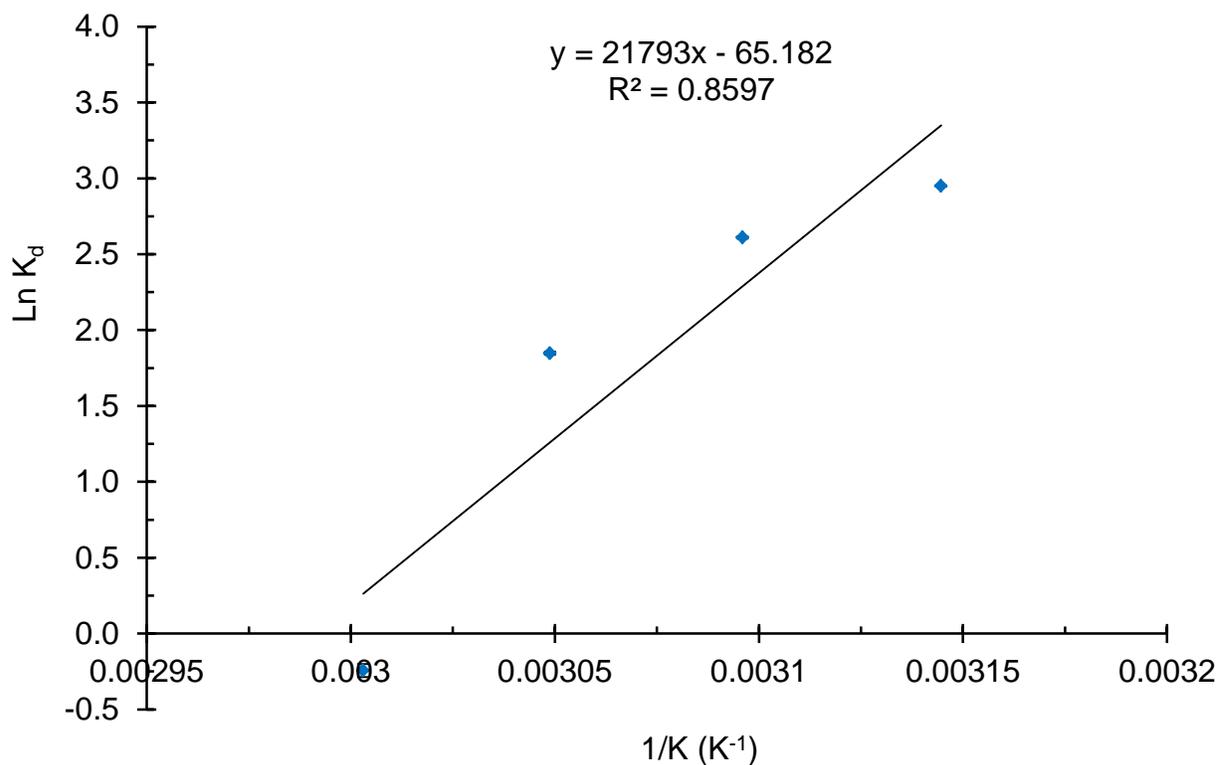


Figura 50. Gráfico de Arrhenius para la energía de desnaturalización de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada. \*Concentración de enzima parcialmente purificada: 150 mg L<sup>-1</sup>; concentración de ABTS: 9 mM; pH: 4.5.

Otros parámetros termodinámicos que se calcularon, en el estado de transición, fueron la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ), la entalpía ( $\Delta H^\ddagger$ ) y la entropía ( $\Delta S^\ddagger$ ), de acuerdo a las Ecuaciones 4, 5 y 6 (Whitaker 1972). La importancia del estado de transición radica en que es la fase por la cual deben pasar las moléculas que reaccionan (enzima y sustrato) para alcanzar una colisión y estructura electrónica tal que permitan realizar la conversión del complejo [ES] a producto. Si únicamente se considera la información proporcionada por los estudios termodinámicos del equilibrio entre el estado inicial y final, no se obtiene información sobre la barrera que presenta la transición. Además, al tratarse de una enzima que actúa como catalizador, resulta

conveniente obtener detalles sobre el estado de transición, pues es la etapa que diferencia a una reacción con y sin catalizador.

El procedimiento para el cálculo de cada uno de dichos parámetros, se describe a continuación, empleando a manera de ejemplo, la temperatura de 40 °C, que fue la temperatura óptima de la lacasa parcialmente purificada en este trabajo.

- *Energía libre estándar ( $\Delta G^\#$ )*

Este parámetro se calculó con la Ecuación (4):

$$\Delta G^\# = -RT * \ln \frac{k_{cat} h}{k_B T}$$

Donde:

$$R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

T= temperatura en Kelvin (313 en este caso)

$$h = \text{constante de Planck} = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J*s}$$

$$k_B = \text{constante de Boltzmann} = 1.381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$$

$$k_{cat} = 25.448 \text{ s}^{-1} \text{ (obtenida con los datos experimentales)}$$

En esta expresión, se utilizó el número de recambio ( $k_{cat}$ ) como una constante de velocidad, pues la concentración de enzima total que participa en la reacción, influye directamente sobre la velocidad de reacción, de manera que mientras más grande sea el valor de  $k_{cat}$ , la eficiencia catalítica será mayor; es decir, el número de moléculas de sustrato transformadas en producto por molécula de enzima por segundo, será mayor cuanto mayor sea  $k_{cat}$ .

- Sustituyendo valores en la ecuación anterior se tiene que:

$$\Delta G^\# = -8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol} * \text{K}} * 313 \text{K} * \ln \frac{25.448 \text{ s}^{-1} * 6.626 \times 10^{-34} \text{ J} * \text{s}}{1.381 \times 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}} * 313 \text{K}} = 68361.450 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$$

- Por lo tanto, a 40 °C (313 K), la energía libre de Gibbs fue de 68 361.450 J mol<sup>-1</sup> o bien, 16.33 Kcal mol<sup>-1</sup>.

- *Entalpía estándar* ( $\Delta H^\#$ )

Se calculó despejando  $\Delta H^\#$  de la Expresión (5), pues los valores de la  $E_a$  y  $E_d$  se obtuvieron a partir del gráfico de Arrhenius presentado anteriormente. Así:

$$\Delta H^\# = E_a - RT$$

Donde:

$$R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

T = temperatura en Kelvin (313 en este caso)

$E_a$  = energía de activación (o desnaturalización, según sea el caso)

- Al sustituir los valores se tiene:

$$\Delta H^\# = 11352.767 \frac{\text{J}}{\text{mol}} - 8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}} * 313\text{K}$$

- El resultado para de la entalpía a 40 °C es de 8750.485 J mol<sup>-1</sup>, equivalente a 2.09 Kcal mol<sup>-1</sup>. Para la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ), el procedimiento fue igual, salvo que el valor de  $E_a$  fue sustituido por el valor de la energía de desnaturalización ( $E_d$ ).

- *Entropía estándar* ( $\Delta S^\#$ )

Este parámetro se obtuvo despejando a  $\Delta S^\#$  de la Ecuación 6, de modo que la expresión se puede escribir como sigue:

$$\Delta S^\# = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

- Para una temperatura de 40 °C (313 K), el valor fue:

$$\Delta S^\# = \frac{8750.485 \frac{\text{J}}{\text{mol}} - 68361.450 \frac{\text{J}}{\text{mol}}}{313\text{K}}$$

- Este cálculo dio como resultado un valor para la entropía de -190.450 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> (0.045 Kcal mol<sup>-1</sup>). La misma expresión se utilizó para cada una de las temperaturas ensayadas.

En el Cuadro 15, se presentan los resultados obtenidos para los 3 parámetros termodinámicos en estado de transición, a cada una de las temperaturas de incubación de la lacasa parcialmente purificada. Sin embargo, no se pudo realizar alguna comparación con otras referencias bibliográficas, debido a que en la mayoría de las investigaciones para la lacasa, la caracterización esencial es en base a los parámetros cinéticos, así como la temperatura y pH óptimo.

Cuadro 15. Parámetros termodinámicos de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada.

<b>FASE DE ACTIVACION</b>			
Temperatura (°C)	$\Delta G_a^\#$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_a^\#$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_a^\#$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
20	15.25	2.13	-0.044
25	15.52	2.21	-0.044
30	15.79	2.11	-0.045
35	16.06	2.10	-0.045
40	16.33	2.09	-0.045
<b>FASE DE DESNATURALIZACIÓN</b>			
Temperatura (°C)	$\Delta G_d^\#$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d^\#$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_d^\#$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
45	16.60	42.67	0.081
50	16.88	42.66	0.079
55	17.15	42.65	0.078
60	17.42	42.64	0.076
$E_a = 2.71 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ; $E_d = 43.30 \text{ Kcal mol}^{-1}$			

Se puede destacar que la energía libre estándar de la proteína nativa ( $\Delta G_a^\#$ ) y desnaturalizada ( $\Delta G_d^\#$ ), es semejante, debido a que se trata de la energía adicional (por encima de la energía libre promedio de las moléculas reactantes) que han de alcanzar las moléculas para llegar al estado de transición, indistintamente del grado de desnaturalización de la proteína, ya que la altura de la barrera de energía libre a alcanzar para realizar la conversión a productos, es la misma con ambas conformaciones estructurales. Además, dado que  $\Delta G_a^\#$  y  $\Delta G_d^\#$  tuvieron valores

positivos, significa que la reacción no fue espontánea; es decir, que la reacción no se produjo por sí sola.

Sin embargo, al ocurrir la desnaturalización de la enzima parcialmente purificada a causa del aumento en la temperatura de incubación, la entalpía estándar de desnaturalización ( $\Delta H_d^\#$ ) es afectada negativamente, por lo que surge la necesidad de que la enzima absorba una mayor cantidad de energía (reacción endergónica) para catalizar la reacción; por el contrario, cuando la enzima mantiene su estructura nativa, la cantidad de energía absorbida por el catalizador es menor, de modo que  $\Delta H_a^\#$  es menos positivo (aproximadamente  $2 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ) que en la fase de desnaturalización ( $42 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ), al mismo tiempo que la entropía estándar de activación ( $\Delta S_a^\#$ ) es negativa, indicando un mayor orden en las moléculas. En cambio, al desnaturalizarse la enzima, las moléculas tienden a una conformación de desorden, por lo que los valores de la ( $\Delta S_d^\#$ ) son positivos. Por lo tanto, se deduce que el sentido de la reacción tiende a pasar de un estado ordenado (fase de activación) a uno desordenado (fase de desnaturalización), ya que mantener el orden implica un mayor gasto de energía.

#### **6.8.5 Estabilidad a la temperatura**

La termoestabilidad de la enzima se vio afectada negativamente cuando se aumentó el tiempo de incubación de la misma. Así, a 25, 30 y 35 °C, la lacasa fue estable por 15 min, conservando 80 % o más, de su actividad remanente; a 40 °C, que fue la temperatura óptima, la lacasa únicamente conservó 78.12 % de su actividad inicial, luego de ser incubada por 15 min a dicha temperatura; a 45 y 50 °C, la actividad residual fue 55.16 y 30.79 %, respectivamente, en tanto que a 55 y 60 °C, la actividad relativa fue de 9.31 y 0.13 %, respectivamente. Por tanto, temperaturas superiores a 45 °C, provocan la desnaturalización de la lacasa (Figura 51).

En base a estos resultados, se puede observar que la lacasa parcialmente purificada, no es una enzima termoestable, pues aún a su temperatura óptima, la enzima perdió 21.88 % de su actividad, luego de un periodo de 15 min de incubación. Esto limita la aplicación de lacasa producida en procesos donde su uso se ha estudiado

exhaustivamente, como el biopulpeo del papel y el desteñido de la mezclilla en la industria textil, los cuales se realizan a altas temperaturas (mayor a 60 °C), por dos razones principales: 1) la temperatura óptima de la lacasa fue de 40 °C y 2) para mantener, cuando menos, 80 % de su actividad, se requiere de temperaturas de proceso comprendidas entre 20 y 35 °C. Por lo tanto, la lacasa puede ser aplicada en otras áreas que no involucren el uso de elevadas temperaturas, como en el área de alimentos, en la estabilidad del vino por ejemplo.

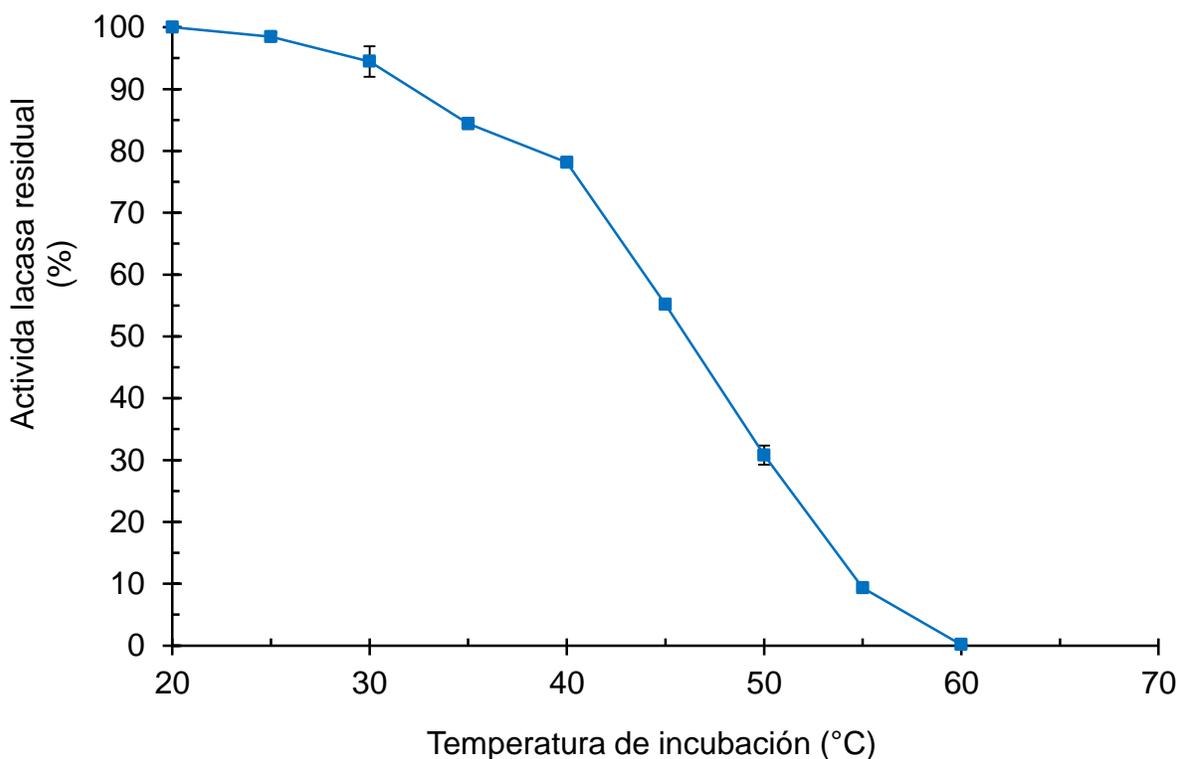


Figura 51. Estabilidad a la temperatura de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada. \*Concentración de enzima: 150 mg L<sup>-1</sup>; concentración de ABTS: 9 mM; pH: 4.5.

Estudios similares documentan que la lacasa de *Pleurotus eryngii* tuvo una temperatura óptima de 65 °C; sin embargo, sólo fue estable a 45 °C durante 10 minutos y a 50 °C, disminuyó 50 % de su actividad después de 30 minutos (Muñoz *et al.*, (1997). Liu y colaboradores (2009), reportaron que a 50 °C la lacasa de *P. ostreatus* cepa 10969, mantuvo más del 90 % de su actividad durante 60 minutos, en tanto que a 40 °C, conservo aproximadamente 82 % de su actividad residual después

de 60 minutos de incubación. En este mismo estudio, se reporta una actividad remanente del 80 % después de 15 minutos de incubación a 30 °C; tiempos prolongados provocaron una pérdida de hasta 40 % de la actividad.

Para la isoforma Lcc1 de *Lentinula edodes* (Nagai *et al.*, 2002) y la isoforma de *Mauginiella* sp. (Palonen *et al.*, 2003), se encontró una máxima actividad a 40 °C, pero en ambos casos, las isoformas fueron inestables en un amplio intervalo de temperatura. Con respecto a la lacasa de *Chaetomium thermophilum*, ésta fue estable a 50 y 60 °C durante 1 hora (Chefetz *et al.* 1998) y la lacasa de *Myceliophthora thermophila* fue estable a 60 °C en el mismo tiempo (Berka *et al.* 1997).

#### **6.8.6 Efecto del pH sobre la actividad lacasa**

La lacasa parcialmente purificada tuvo un pH óptimo de 4.0, el cual se encuentra dentro del intervalo de pH óptimo (3 a 5) reportado para las lacasa producidas por hongos basiomicetos (Medina, 2003). A pH de 3.5 y 4.5, la actividad enzimática no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), conservando 93.31 y 95.43% de actividad, respectivamente, con respecto a la encontrada al pH óptimo ( $346.67 \text{ U mi}^{-1}$ ). A pH 3.0, la velocidad de reacción fue del 48.51 % en comparación con la obtenida a pH 4.0, mientras que pH's superiores a 6.0 ocasionan una pérdida en la velocidad de reacción de más del 57.30 % (Figura 52). No obstante, la lacasa estudiada conservó su actividad dentro del intervalo de pH señalado por Ramírez *et al.*, (2003), que va desde pH 3 hasta pH 10.

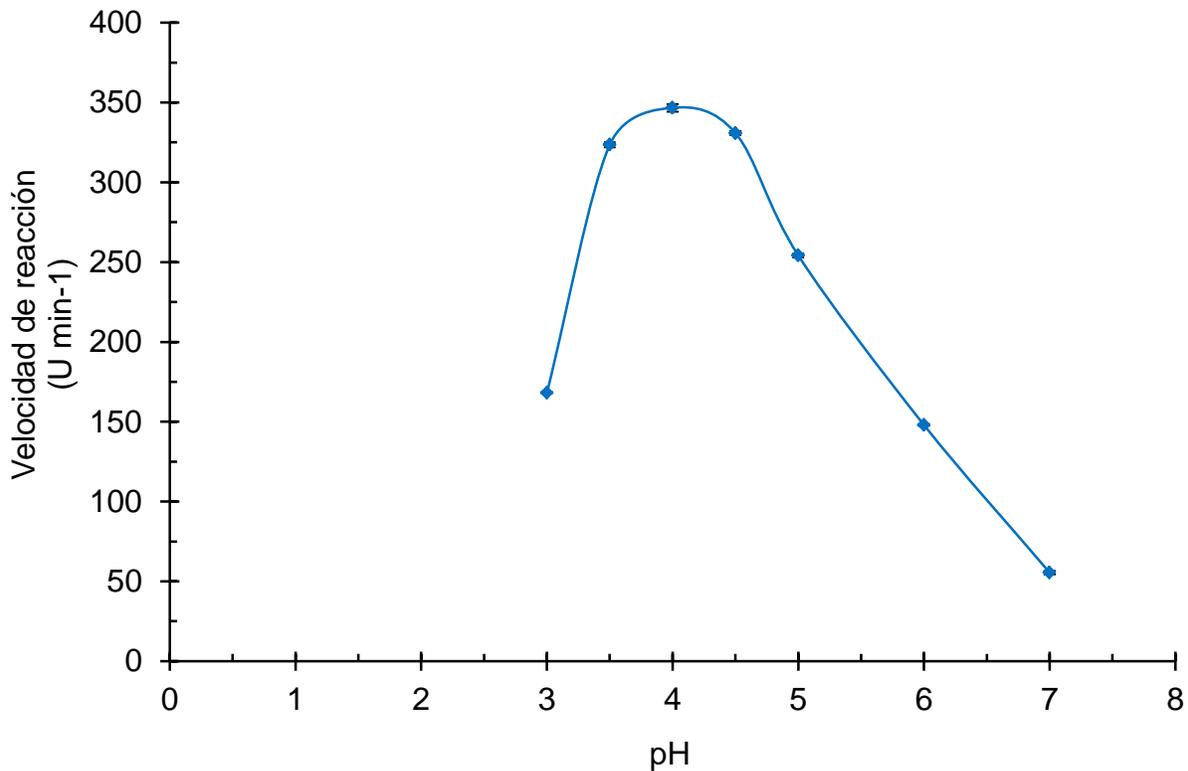


Figura 52. Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la lacasa de *P. ostreatus*, parcialmente purificada. \*Concentración de enzima: 150 mg L<sup>-1</sup>; concentración de ABTS: 9 mM; temperatura de reacción: 40 °C.

Un pH óptimo de 4.5 se encontró para la isoforma L<sub>1</sub>1 de *P. ostreatus*, a una temperatura de reacción de 45 °C (Tlecuítl *et al.*, 2008). Liu *et al.*, (2009), obtuvieron una máxima actividad enzimática por la lacasa de *P. ostreatus* cepa 10969, a pH 4.0 y a 50 °C, mientras que Ramírez *et al.*, (2003), reportaron un pH óptimo de 2.5 y 1.5, a 50 y 40 °C, para las isoformas I y II de *P. ostreatus*, respectivamente. Cabe mencionar que la forma de la curva actividad-pH, varía con la concentración y tipo de sustrato, ya que el valor de  $K_M$  también cambia con el pH en varias enzimas. Además, el pH óptimo de una enzima, no es necesariamente igual al de su entorno, por lo tanto este es un factor de control de la actividad (Muñoz *et al.*, 1997; Medina, 2003).

Finalmente, a partir de la velocidad de reacción obtenida a cada pH, se construyó un gráfico de Dixon-Weeb (Figura 53) para determinar el grupo prototrópico de la enzima que puede ionizarse (Dixon y Webb, 1979). Con esta herramienta se encontró que los valores de pK del grupo presente en la proteína fueron de 3.6 y 4.6, valores que

señalan que el grupo prototrópico que se encuentra involucrado en el sitio activo de la enzima y la acción de ésta, es el grupo  $\beta$ -carboxilo (aspártico), cuyo pKa es desde 3.0 hasta 4.7 (Dixon y Webb, 1979).

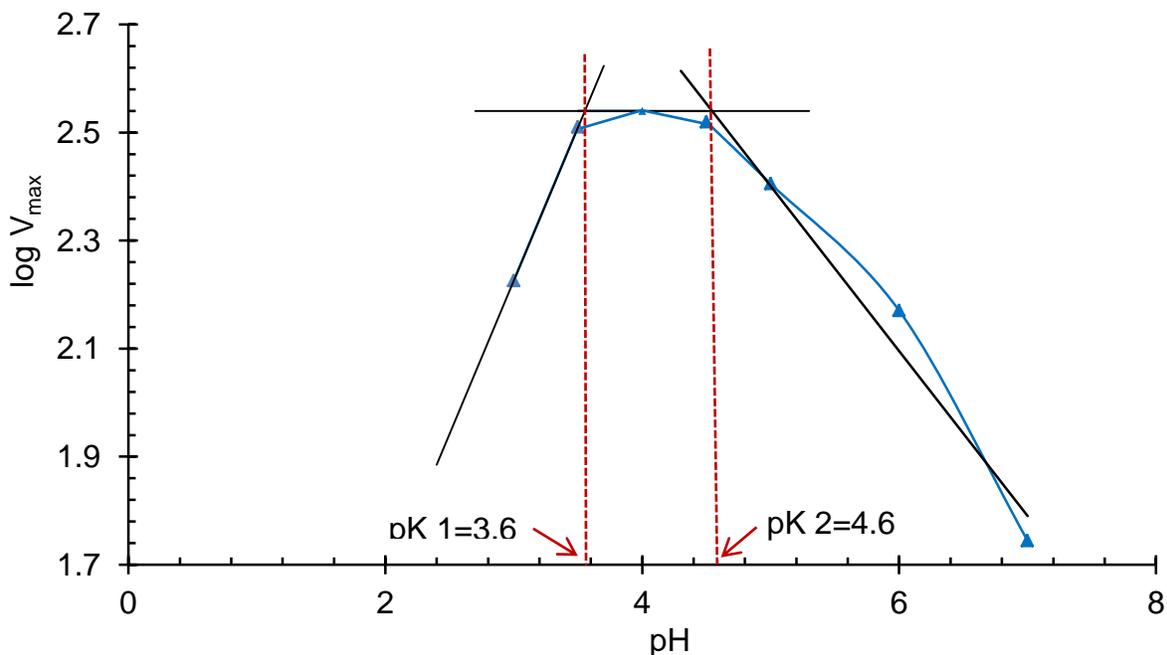


Figura 53. Determinación del pK 1 y pK 2 de la lacasa producida por *P. ostreatus*, parcialmente purificada, de acuerdo al método de Dixon-Webb.

De manera general, se puede destacar que el aprovechamiento del agave, particularmente las hojas de éste, es una alternativa viable para aminorar el impacto ambiental que tiene los desechos de la industria tequilera, mediante la producción de lacasas de *P. ostreatus*, hongo que ha demostrado su alta capacidad para la producción de esta enzima en comparación con otros HPB.

Así pues, las mejores condiciones para la producción de lacasa a nivel biorreactor, se obtuvieron en un sistema de fermentación sumergida durante un periodo de fermentación de 120 h, utilizando una concentración de penca como sustrato, del 1 % (p/v) y agua destilada estéril como medio líquido. El tiempo de fermentación fue corto si se compara con otros estudios o con un sistema de fermentación sólida, aspecto que resulta una ventaja para la producción de lacasa a nivel industrial. No obstante, la composición del medio de fermentación, posiblemente permite reducir los costos de

producción de la enzima, pues no es necesario adicionar otros nutrientes o inductores al medio de cultivo para alcanzar una alta actividad específica. Entonces, se puede deducir que el efecto únicamente de la penca de agave tuvo un efecto positivo sobre la capacidad de producción de lacasa por *P. ostreatus*. Sin embargo, este trabajo constituye una línea de investigación para estudios posteriores que busquen mejorar las condiciones para aumentar la producción de la enzima en estudio utilizando la penca de agave como sustrato, al mismo tiempo de realizar una mayor purificación de la misma.

## 7. CONCLUSIONES

- El hongo *P. ostreatus* mostró la más alta capacidad para la producción de lacasas, comparado con el resto de las cepas propuestas.
- El tiempo óptimo para la máxima producción de lacasa en fermentación sumergida, fueron 120 h, utilizando penca o fibra como sustrato.
- La concentración óptima de sustrato, para una alta actividad de lacasa, fue del 1% (p/v) en fermentación sumergida.
- La adición de glucosa al medio mineral estéril, no produjo un cambio significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la actividad específica de la lacasa, cuando se utilizó fibra o penca como sustrato.
- La fermentación sumergida usando fibra o penca como sustrato, fue el mejor sistema de producción de lacasa, en comparación con la fermentación en estado sólido.
- El mejor tratamiento para la máxima producción de lacasa, fue en fermentación sumergida durante 120 h, utilizando penca de agave como sustrato, a una concentración del 1 % (p/v) y agua destilada estéril como medio de cultivo en lugar de medio mineral estéril.
- El escalamiento en matraz no tuvo resultados eficientes; en cambio, la producción en biorreactor sí es factible de llevarse a cabo en un solo ciclo de 120 h de fermentación sumergida, para lograr una máxima producción de lacasa utilizando penca como sustrato y agua destilada estéril como medio líquido.
- La lacasa parcialmente purificada, tuvo un valor de  $K_M$  de 5.86 mM, una  $V_{max}$  de 357.14 U min<sup>-1</sup> y una  $k_{cat}$  de 25.44 s<sup>-1</sup>.
- Se encontraron dos isoformas de lacasa con pesos moleculares de 67.7 y 60.4 kDa.
- La temperatura óptima de la lacasa parcialmente purificada fue 40 °C, pero fue inestable a la temperatura después de 15 minutos de reacción.
- El pH óptimo de la lacasa parcialmente purificada, fue 4.0.
- Por lo tanto, el aprovechamiento de los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato, es una alternativa viable, para la producción de una isoforma de lacasa más activa que la producida únicamente por el hongo libre.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

### A

- Acunzo F., y Galli C. 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase induced oxidation of lignin models. *Eur J Biochem.* 270: 3634-3640.
- Acunzo, F., Galli, C., y Masci, B. 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems solubility and steric issues. *Eur J Biochem. FEBS.* 269: 5330-5335.
- Alonso, B. S., Montiel, G. A. M., Tomasini, A., Sánchez, C. y Díaz, G. G. 2007. Comparación de las enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* producidas por fermentación sólida y sumergida. Resumen.
- Ardon, O., Kerem, Z. y Hadar, Y. 1996. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *J Biotechnol.* 51:201-207.

### B

- Balam C. R. J., Duarte A. S., Canche E. G. 2006. Obtención y caracterización de materiales compuestos de fibras de la “piña” de henequén y polipropileno. *Rev Mex Ing Quim.* 5: 39-44.
- Baldrian, P. 2006. Fungal lacasses-ocurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev.* 30: 215-242.
- Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. y Xu, F. 1997. Characterization of the gene encoding and extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol.* 63: 3151-3157.
- Bidwell, R. G. S. 1979. Fisiología vegetal. Primera edición en español. AGT, Editor, S. A. pp 260-261.
- Bonomo, R. P., Boudet, A. M., Cozzolino, R., Rizzarelli, E., Santoro, A. M., y Sterjlades, R. 1998. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by “White-rot” fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. *J Inorg Biochem.* 71: 205-211.

- Bourbonnais, R., Paice, M., Reid, I., Lanthier, P. y Yaguchi, M. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2 Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol.* 61 (5): 1876-1880.
- Bousios, A., Saldana-Oyarzabal, I., Valenzuela-Zapata, A. G., Wood, C. and Pearce, S. R. 2007. Isolation and characterization of Ty1- *copia* retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Sci.* 172: 291-298.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

## C

- Cañas, P. 2009. Diseño de nuevos sistemas lacasa mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Madrid, España. 209 p.
- Castro, S. M. A. 2005. Oxidación enzimática de sustratos utilizando diversos mediadores. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 96 p.
- Chawachart, N.; Khanongnuch, C.; Watanabe, T. y Lumyong, S. 2004. Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3. *Fungal Diversity.* 15: 23-32.
- Chefetz, B., Chen, Y. y Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and role in humification. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3175-3179.
- Cisterna, C. 2003. Cultivo del champiñón ostra en Chile. 1ª Edición. Editorial Mycotec, Ltda. Chile. 118 p.

## D

- Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Lacazio G., Gil, G. y Le Petit J. 2000. Biochemical and characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 66: 925-929.
- Deleé, W., Oneil, C., Hawkes, F. R. y Pinheiro, H. M. 1988. Anaerobic treatment of textil effluents: A review. *J Chem Tech Biotechnol.* 73: 323-335.

- Desai, S. S. y Nityanand, C. 2011. Microbial laccases and their applications: A review. *Asian J Biotechnol.* 3 (2): 98-124.
- Desentis, M. R. M. 2006. Caracterización parcial de lacasa y tirosinasa de *Ustilago maydis* y su efecto sobre la actividad antioxidante de compuestos fenólicos. Tesis de Doctorado. IPN. México. 100 p.
- Dixon, M. y Webb, E. C. 1979. *Ezymes*. Tercera Edición. Academic Press, E.U.A. 1116 p.
- Dowson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H. y Jones, K. M. 1969. Data for biochemical research. Clarendon Press. Oxford, E. U. A. pp 475-508.
- D'Souza, T., Boominathan, K., y Reddy, A. 1996. Isolation of laccase gene specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 62 (10): 3739-3744.

## E

- Edens, W., Goins, T., Dooley, D. y Henson, J. 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*. *Appl Environ Microbiol.* 65 (7): 3071-3074.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D. y Eriksson, K. L. 1995. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabaric acid. *FEBS Lett.* 376: 202-206.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Khardziani, T. y Bakradze, M. 2002. Physiological regulation of edible and medicinal higher Basidiomycetes lignocellulolytic enzymes activity. *Int J Med Mushrooms.* 4(2): 159-166.
- Enríquez, R. A. 1981. Estudio de prefactibilidad para la obtención de pulpa celulósica a partir del maguey tequilero. Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. IPN. 120 p.

## F

- Fernández, J. y Henao, L. 2007. Evaluación de tres hongos basidiomicetos inmovilizados en *Luffa cylindrica* y fotocátalisis con TiO<sub>2</sub> para la remoción del Negro reactivo 5. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 154 p.

- Fernández-Larrea J. y Stahl, U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. Mol Genet Genomics. 252: 539-551.
- Fischer, L. 1980. Gel filtration chromatography. Elsevier, Amsterdam.
- Fukushima, Y. y Kirk, T. K. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. Appl Environ Microbiol. 61: 872-876.

## G

- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J. y Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiol. 148: 2159-2169.
- García O., Camarero S., Colom J. F., Martínez A. T., Martínez M. J., Monje, R. y Vidal T. 2003. Optimization of a laccase mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. Holzforschung. 57 (5): 513-519.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Farazo, V., Cennamo, G. y Sannia, G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biochem J. 341: 655-663.
- Giardina, P., Autore, F., Farazo, V., Festa, G., Palmieri, G., Piscitelli, A. and Sannia, G. 2007. Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. Appl Microbiol Technol. 75: 1293-1300.
- Gigi, O., Marbach, I. y Mayer, A. M. 1980. Induction of laccase formation in *Botrytis*. Phytochem. 19 (11): 2273-2275.
- Glazer, A. y Nikaido, H. 1998. Microbial Biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. W. H. Freeman and Company. USA. pp. 334-347.
- Glenn, J., Morgan, M., Mayfield, M., Kuwahara, M. y Gold, M. 1983. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem Biophys Res Commun. 14: 1077-1083.
- Gorbatova, O. N., Stepanova, E. U., Koroleva, O. V. 2000. Certain biochemical and physicochemical properties of the inducible form of extracellular laccase from basidiomycetes *Coriolus hirsutus*. Paia Biokhimiia i Mikrobiologija. 36: 272-277.

- Guillén, N. G. K., Márquez, R. F. J. y Sánchez, V. J. E. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev Iberoam Micol. 15: 302-306.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gómez-Toribio, V., Martínez, A. y Martínez, M. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. Appl Environ Microbiol. 66 (1): 170-175.
- Guo-Qing, Z., Yi-Fan, W., Xiao-Qing, Z., Tzi, B. N. y He-Xiang, W. 2009. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. Process Biochem. 45 (5): 627-633.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velasco, C. y Guzmán-Dávalos, L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Primera edición. Editorial IPN-SEP. México. 35-47 pp.

## H

- Hagel, L. y Janson, J. C. 1992. Size-exclusion chromatography. 5ª. Edición. Elsevier, Ámsterdam. pp 267- A307.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. Reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Segunda edición. Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp. 19-35.
- Huber, M. y Lerch, K. 1987. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. FEBS Letters. 219(2): 335-338.
- Huitrón C., Pérez R., Sánchez A. E., Lappe P., Rocha, Z. L. 2008. Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. J Environ Biol. 29 (1): 37-41.

## I

- Iñiguez-Covarrubias, G., Díaz-Teres, R., Sanjuan-Dueñas, R., Anzaldo-Hernández, J. y Rowell, R. M. 2001. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. Bioresource Technol. 77: 101-108.

## J

- Janson, J. C. y Rydén, L. 1998. Introduction (Cap. 1). En: Protein Purification. Wiley-VCH. pp. 3- 40.

- Jiménez, T. G. A., Mejía, G. A. I. y López, O. B. L. 1999. Actividad de las enzimas ligninolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de  $Mn^{+2}$ . Rev Acad Colomb Cienc. 23(89): 587-594.
- Jordaan, J., Pletschke, B. I. y Leukes, W. D. 2004. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. Enzyme Microbial Technol. 34: 635-641.

## K

- Kirk, K. T. y Fenn, P. 1982. Formation and action of ligninolytic system in basidiomycetes. British Mycological Society. Simposium 4. Cambridge University Press. pp. 67-70.
- Krishna, P. K., Venkata, M. S., Sreenivas, R. R., Ranjan, P. B. y Sarma, P. N. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. Biochem Eng J. 24: 17-26.
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. 2006. Laccases and their applications: A patent review. Instituto de catálisis y petroleoquímica, CSIC. España. 50 p.

## L

- Lee, K. H., Wi, S. G., Singh, A. P. y Kim, Y. S. 2004. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. J Wood Sci. 50 (3): 281–284.
- Li, K., Xu, F. y Eriksson, K. E. 1999. Comparison of fungal and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. Appl Environ Microbiol. 65: 2654-2660.
- Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Zheng, C., Lin, Z., Wang, S. y Wang, Z. 2009. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. Enzyme Microbial Technol. 44: 426-433.
- López, J. 2001. Relación entre la actividad de las enzimas lacasa y la maduración de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonaris*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 173 p.

- Locci, E., Laconi, S., Pompei, R., Scano, P., Lai, A. y Marincola, C. 2008. Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. *Bioresource Technol.* 99 (10): 4279-4284.

## M

- Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J. B., Brizuela, M. A., González, A. D. 1997. Identification of laccase gene family in the new lignin degradation basidiomycete CECT 20197. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2637-2646.
- Manzano, A., León, T., Arguelles, J., Leal, R., China, R., Guerra, G., Casado, G., Sánchez, M. y Gómez, B. 2004. Hongos de la podredumbre blanca con capacidad ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal. *Rev Biol.* 18: 26-30.
- Marbach, I., Harel, E. y Mayer A. M. 1983. Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* 22 (7): 1535-1538.
- Martínez, S. M., Pedrosa, R. A., Rodríguez, V. R. y Rosas, A. J. 2005. Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelerero en un biorreactor de lecho fluidizado. *Revista de Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.* 10 (2): 27-26.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y Ahern, K. G. 2002. *Biochemical.* Tercera Edición. Pearson Educación. Madrid, España. 1335 p.
- Mayer, A. M. y Staples, R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.* 60: 551-565.
- Medina, R. E. 2003. Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos. Tesis Maestría Universidad Autónoma Metropolitana. 71 p.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E. y Loera, O. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technol.* 99: 7842-7847.
- Mester, T., Swarts, H. J., Sole, S. R. I., de Bont, J. A. M. y Field, J. A. (1997). Stimulation of aryl metabolite production in the basidiomycete *Bjerkandera* sp. strain

BOS55 with biosynthetic precursors and lignin degradation products. *Appl Environ Microbiol.* 63: 1987-1994.

- Minussi, R. C., Pastore, G. M. y Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 13 (6): 205–216.
- Minussi, R. C., Miranda, M. A., Silva, J. A., Ferreira, C. V. y Aoyama, H. 2007. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mil wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Afr J Biotechnol.* 6:1248-1254.
- Monroy, H. O. y Viniegra G. G. 1981. *Biología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos.* AGT Editor, S. A. México, 260 p.
- Mouso, N., Papinutti, L. y Forchiassin, F. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Rev Iberoam Micol.* 20: 176-178.
- Muñoz, C., Guillén, A., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2166-2174
- Murrieta, H. D. M., Mata, G. e Iglesias, A. L. G. 2002. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. Cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruzana.* 4(1): 47-52.

## N

- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M. y Enei, H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dye. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60: 327-335.
- Nobel. P. S. y Valenzuela, A. G. 1987. Environmental responses and productivity of the CAM plant, "*Agave tequilana*". *Agricultural and Forest Meteorology.* 39 (4): 319-334.

## O

- Oliveira L. A., Porto A.L. F. y Tambourgi E.B. 2006. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technol.* 97: 862-867.

## P

- Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R. y Sannia, G. 1993. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 39: 632-636.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biol Chem.* 272: 31303-31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 66(3): 920-924.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Farazo, V., Amoresano, A., Sannia, G. y Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes Fromm copper supplemented *Pleurotus ostratus* cultures. *Enzyme Microbiol Technol.* 33: 220-230.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L. y Kruus, K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme Microbiol Technol.* 30: 854-862.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R. y Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci.* 77: 149-162.
- Papinutti, V. L. y Forchiassin, F. 2007. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *J Food Eng.* 81: 54-59.
- Parra, L. A. 2005. Aprovechamiento integral de los Agaves, productos y subproductos. Memoria Virtual del 2<sup>do</sup> Simposium Nacional de Agave, Tequila y Mezcal. Cd. Victoria Tamaulipas.
- Parra, L. y Macias, J. 2005. Usos potenciales del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul). Instituto de ciencias agrícolas de la Universidad de Guanajuato, México.
- Pinzón, C. 2004. Implementación de un biorreactor de lecho fijo operado con pulsaciones de aire y oxígeno empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en

espuma de poliuretano para reducir el color de efluentes provenientes de la industria papelera. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 211 p.

- Pezet, R. 1998. Purification and characterization of a 32 KDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers. Fr. Microbiol Letters. 167: 203-208.
- Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white rot fungi. Appl. Microbiol Biotechnol. 57:20-33.
- Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C. L. y Gratzl, J. 1995. Selective enzymatic oxidation of aromatic methylgroups to aldehydes. J Org Chem. 60:4320-4321.

## Q

- Quintero, D. J. C., Feijoo, C. G. y Lema, R. J. M. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 13(2): 61-67.

## R

- Radha, K. V., Regupathi, I., Arunagiri, A. y Murugesan, T. 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. Process Biochem. 40: 3337-3345
- Ramírez, N. E., Vargas, M. C., Ariza, J. C. y Martínez, C. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. Rev Colomb Biotec. 5(2): 64-72.
- Rypáček, V. 1977. Chemical composition of hemicellulose as a factor participating in the substrate specificity of wood destroying fungi. Wood Sci Technol. 11 (1): 59-67.
- Reyes, P., Pickard, M. A. y Vazquez-Duhalt, R. 1999. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilised laccase. Biotechnol Letters. 21: 875-880.
- Rodríguez, C. S., Gundín, M., Lorenzo, M. y Sanromán, M. A. 2002. Screening of supports and inducers for lacasse production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. Process Biochem. 38: 249-255.

- Rodríguez, C. S., Moldes, D., Liébanas, A. y Sanromán, A. 2003. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. *Biochem Eng J.* 15: 21-26.
- Rodríguez, C. S. y Toca, H. J. L. 2007. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv.* 24: 500-513.
- Rodríguez, C. S y Toca H. J. L. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotech. Adv.* 25: 558-569.

## S

- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica. pp. 106, 109, 355-356.
- Sánchez, V. J. E. y Royse, D. J. 2001. Crecimiento y fructificación. En: *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* Ecosur. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México, Ed.
- Sannia, G., Giardina, P., Luna, M., Rossi, M. y Buonocore, V. 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol Lett.* 8: 797-800.
- Sariaslani, F. S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Rev Biotechnol.* 9: 171-257.
- SAS Institute. *SAS/STAT Users guide*. 1998. Versión 8.0. SAS Inst., Cary, NC. USA. 595 p.
- Sasaki, T., Kajino, T., Li, B., Sugiyama, H. y Takahashi, H. 2001. New pulp biobleaching system involving manganase peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2208-2212.
- Sathiya, P., Periyar, L., Sasikalaveni, A. y Murugesan, K. 2006. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *Rev. Iberoam Micol.* 19: 65-73.
- Schwarze, F., Engels, J. y Mattheck, C. 2000. Fundamental aspects. En *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer. 5-31 pp.
- Shraddha, R. S., Sehgal, S., Kamthania, M. y Kumar, A. 2011. Laccase: Microbial, sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* Artículo *in press*.

- Solís-Oba, M., Bárzana, E., García-Garibay, M. y Viniegra-González, G. 2007. El ABTS<sup>+</sup>: agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato. *Rev Mex Ing Qui.* 6(3): 275-281.
- Sonden, D. M. y Dobson, A. D. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiol* 147: 1755-1763.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E. y Hadar, Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technol.* 41: 57-61.
- Souza, C., Zilly, A. y Peralta, R. 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *J Basic Microbiol.* 42: 83-90.
- Souza, T. D., Kumar, V. A., Mathew, M. y Raghukumar, C. 2006. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC #2a, isolated from mangrove wood. *Indian J Mar Sci.* 35(4): 364-372.
- Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S. P., Nevo, E. y Vukojevic, J. 2006. Effect of different carbón and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Tech.* 38: 65-73.

## T

- Tien, M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC. Crit Rev Microbiol.* 15: 141-168.
- Tinoco, R., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccase from six *P. ostreatus* strains. *Lett Appl Microbiol.* 32: 331-335.
- Tlecuítl, B. S., Sánchez, C., Loera, O., Robson, G. D. y Díaz, G. G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycol Res.* 112: 1080-1084.

## U

- Urias, J. y López, M. 2004. Efecto prebiótico de los fructanos del agave. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas. CINVESTAV-IPN. 1er encuentro de la participación de la mujer en la ciencia. León Guanajuato – México.

## V

- Voet, D. y Voet, J. 1990. Velocidades de las reacciones enzimáticas (Cap. 13). En: Bioquímica. Omega Editorial. pp. 356-382.

## W

- Whitaker, J. R. 1972. Principles of enzymology for the food sciences. Volumen 2. Editorial Marcel Dekker, Inc. New York, E.U.A. 636 p.

## X

- Xiao, Y. Z., Tu, X. M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, W. y Shi, Y. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. Strain AH28-2. Appl Microbiol Biotechnol. 60: 700-706.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S. H., Wahleithner, J. A., Sundaram, U. M. y Solomon, E. 1996. A study of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. Biochem Biophys Acta. 1292: 303-311.
- Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H. W., Abbate, E., Galinyte, V., y Schneider, P. 2000. Redox chemistry in laccase catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. Appl Environ Microbiol. 66 (5): 2052-2056.

## Z

- Zanón, J., Armengol, J. y Vilaseca, C. 2005. Estudio del síndrome de decaimiento en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Bol. San. Veg. Plagas. 31: 431-441.
- Zheng, Z., Levin, R. E., Pinkham, J. L. y Shetty, K. 1999. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. Process Biochem. 34: 31- 37.

### Referencias electrónicas:

- <http://www.gelanalyzer.com>

## Anexos.

Anexo 1. Cantidad de sulfato de amonio requerido para un determinado grado de saturación.

Starting percent saturation	Final percent saturation to be obtained																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

Fuente: Amersham Bioscience; Dixon y Webb, 1979.

**Anexo 2.** Preparación de regulador ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH aproximado de 2.6-7.6.

pH	x mL de ácido cítrico*, 0.05 M	y mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ *, 0.05 M	NaCl añadida** (mg)
3.0	79.45	24.25	348.2
3.5	73.10	63.50	320.6
4.0	61.45	63.25	269.4
4.5	60.30	65.10	264.3
5.0	55.50	101.50	243.8
6.0	38.85	115.00	170.7
7.0	17.00	126.00	75.0

\* Se consideraron como referencia inicial, los volúmenes de cada componente señalados en Dawson *et al.*, 1969, para este mismo regulador.

\*\* La fuerza iónica final, en cada caso, fue de 0.15.

Para determinar la cantidad de NaCl requerida para ajustar la fuerza iónica de la solución amortiguadora, se tomó en cuenta la siguiente ecuación:

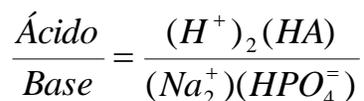
$$I = \frac{1}{2} \sum z^2 * m$$

Donde:

m= molaridad de un ion particular

$z^2$ = carga del ion

Para ilustrar lo anterior, se dará el ejemplo de la cantidad de sal necesaria para la solución de pH 7.0 utilizada en este trabajo, tomando en cuenta que la disociación del ácido y la base usados se da de la siguiente manera:



Sustituyendo cada uno de los términos en la ecuación de fuerza iónica, con los datos experimentales obtenidos se tiene que:

$$I = \frac{(17.0)(1^2)(2) + (126.0)(1^2)(2) + (17.0)(1^2) + (126.0)(2^2)}{2(17.0 + 126.0)} * 0.05 = 0.1410$$

Esto significa que la fuerza iónica inicial de la solución amortiguadora a pH 7.0 es de 0.1410. Sin embargo, la fuerza iónica se ajustó a 0.15 para todos los casos, por lo tanto, el diferencial de fuerza iónica es:

$$I_f - I_i = 0.150 - 0.1410 = 0.009$$

Dado que para el NaCl la fuerza iónica es igual a la concentración de la solución salina, se tiene que:

Una solución de NaCl con una fuerza iónica  $I=1.0$  (equivalente a una concentración 1 M), tiene  $58.4 \text{ g mol}^{-1} \text{ L}^{-1}$ , por lo que para una  $I=0.009$ , se necesitan 0.525 g para un litro de solución, pero como el volumen final obtenido con la mezcla de ácido y base, para la solución de pH 7.0, fue de 143 mL, entonces se necesitan 0.0751 g de sal, que son equivalentes a 75.0 mg de NaCl, mismos que se disolvieron en la solución amortiguadora. Este mismo protocolo se utilizó para cada valor de pH, considerando una fuerza iónica final de 0.15.